

Titre: Procédés de culture cellulaire pour un système CHO inductible :
Title: cuvée-alimentée et perfusion

Auteur: Kahina Mellahi
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Mellahi, K. (2018). Procédés de culture cellulaire pour un système CHO
Citation: inductible : cuvée-alimentée et perfusion [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3696/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3696/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Olivier Henry, & Michel Perrier
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PROCÉDÉS DE CULTURE CELLULAIRE POUR UN SYSTÈME CHO INDUCTIBLE :
CUVÉE-ALIMENTÉE ET PERFUSION

KAHINA MELLAHI

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE CHIMIQUE)

NOVEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

PROCÉDÉS DE CULTURE CELLULAIRE POUR UN SYSTÈME CHO INDUCTIBLE :
CUVÉE-ALIMENTÉE ET PERFUSION

présentée par : MELLAHI Kahina

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., président

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre

M. TREMBLAY Gilles, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À mes chers parents

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mon superviseur, le professeur Olivier Henry pour m'avoir donné la chance d'accomplir mon projet de recherche et de vivre une expérience stimulante. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour son encadrement et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce programme. Je remercie également mon codirecteur de recherche, M. Michel Perrier pour le soutien alloué, lui qui est à l'origine de ma venue à Polytechnique Montréal.

Merci au professeur Gregory De Crescenzo pour m'avoir compté parmi ses membres de laboratoire, pour ses conseils précieux et pour m'avoir permis de partager des moments agréables autour d'un repas ou de discussions de couloir.

Je remercie également le professeur Mario Jolicoeur pour les occasions de développement dont j'ai bénéficié au travers des différentes charges de cours et pour le support matériel fourni.

Ensuite, ce séjour au Canada n'aurait été aussi intéressant sans la présence de personnes aussi chères avec qui j'ai pu partager de longs fous rires sans raison, des moments agréables autour d'un repas ou lors de nos soirées jeux au cours desquelles j'excellais... Cette expérience n'aurait pas été complète sans les pauses nourritures dans le bureau voisin (2086), sans les diverses activités de groupe (randonnée, bénévolat, atelier, etc.) et tant d'autres détails qui seront à jamais gravés dans ma mémoire. Un grand merci à vous : Éric, Benoit, Yuan, Frédéric, Nesrine, Cécile, Gwendoline, Audrey, Adeline, Qi, Alina, Cyril, July, Anaïs, Julien, Florian et tous les autres.

J'aimerais particulièrement remercier ma petite famille qui m'a soutenue dans tous mes choix et sans lesquels je ne serai jamais arrivée à un tel accomplissement. Merci d'avoir cru en moi!

Enfin, merci à toi Yahia, pour ton soutien et ton amour inconditionnel. Merci de m'avoir motivée dans les moments difficiles avec tes blagounettes et ta bonne humeur.

RÉSUMÉ

La production de protéines thérapeutiques représente de nos jours l'un des marchés les plus fructueux de l'industrie pharmaceutique. Les rendements de production ont considérablement augmenté au cours de ces dernières décennies en raison des améliorations significatives apportées au niveau des procédés de culture et des systèmes d'expression. Les cellules de mammifères, qui sont aptes à réaliser des modifications post-traductionnelles essentielles aux fonctions biologiques de ces protéines, demeurent la plateforme d'expression de choix et les cellules CHO restent de loin les plus utilisées pour la production industrielle à grande échelle. Comme la production de protéines recombinantes est généralement non-associée à la croissance cellulaire, les recherches se sont penchées vers le développement de procédés bi-phasiques consistant à d'abord laisser croître les cellules à haute densité, puis de ralentir ou de stopper la croissance pour favoriser l'expression du produit d'intérêt. Dans le même contexte, l'ingénierie cellulaire a permis la mise en place de systèmes d'expression inductibles par lesquels il est possible de réguler la production de protéines. Parmi les systèmes les plus récents, on retrouve le '*cumate gene switch*', dont l'agent inducteur est le cumate. En conférant la capacité de contrôler la production de la protéine d'intérêt, les systèmes inductibles offrent la possibilité de découpler les phases de croissance et de production. Ainsi, l'optimisation des conditions de culture peut être réalisée de manière spécifique à chacune des phases. Malgré la disponibilité grandissante de lignées cellulaires inductibles, le développement de stratégies de culture reposant sur l'emploi de tels systèmes demeure quasi-inexistant dans la littérature.

Le choix d'un mode de culture permettant d'atteindre de hautes concentrations cellulaires avec une bonne productivité est essentiel. Les modes cuvée-alimentée (*fed-batch*) et perfusion représentent les modes opératoires les plus employés en culture cellulaire avec, notamment, une certaine préférence pour le mode cuvée-alimentée en raison de sa flexibilité et une plus grande facilité de mise en œuvre à grande échelle. Le défi majeur pour un tel mode de culture réside dans l'élaboration d'une stratégie d'alimentation permettant de répondre aux besoins cellulaires à chaque étape de la culture. L'objectif général de cette thèse est donc d'optimiser le rendement de production d'un système CHO inductible au cumate et produisant un anticorps monoclonal (Rituximab) par le biais de stratégies de culture cuvées-alimentées et perfusion.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le mode cuvée-alimentée permet d'améliorer d'un facteur trois le rendement en produit par rapport à des cultures en mode cuvée.

Nous avons également étudié l'effet du moment d'induction sur la productivité des cultures en mode cuvée-alimentée afin de mettre en lumière la présence d'éventuelles limitations. En balayant une large gamme de concentrations cellulaires, nous avons montré que les rendements de production baissent lorsque l'induction est effectuée à faible ou à haute densité cellulaire. Cependant, une analyse de la distribution des glycanes du produit a révélé que la qualité de l'anticorps est, somme toute, peu affectée par la densité cellulaire à l'induction, mais que le pourcentage de galactosylation diminue avec l'augmentation de la durée des cultures.

Dans un second temps, nous avons étudié différentes stratégies d'alimentation en comparant leurs performances en considérant deux densités cellulaires à l'induction afin d'améliorer le titre en anticorps. Nous avons également investigué l'effet d'une réduction de la température pendant la phase de production, dans le but de favoriser l'expression du produit au détriment de la croissance. Nos résultats ont démontré que l'ajout de nutriments dès le début de la culture et l'emploi d'un taux d'alimentation modéré étaient favorables au niveau des rendements de production. Les meilleurs rendements en flacons et en bioréacteurs ont été obtenus pour des cultures induites à haute densité cellulaire avec une phase initiale de croissance à 37 °C et une production réalisée à 30 °C. Alors qu'une réduction de la température lors de la phase de production s'avère toujours bénéfique, l'analyse de la distribution des glycanes a montré que l'emploi d'une température physiologique lors de la phase de croissance cellulaire était plus favorable qu'un état légèrement hypothermique (34 °C).

En dernier lieu, nous avons investigué la possibilité d'améliorer le rendement en produit pour des inductions à haute densité cellulaire en mettant en place des modes de culture hybrides combinant les avantages des modes opératoires cuvée-alimentée et perfusion. Par des cultures en flacons, nous avons montré qu'un changement de milieu effectué au moment de l'induction permet d'améliorer la performance des cultures. Le rendement des cultures a été amélioré davantage en combinant des changements de milieu et des ajouts d'une solution concentrée de nutriments sur une base journalière durant la phase de croissance, et uniquement des ajouts de solution concentrée pendant la phase de production. En bioréacteur, nous avons montré qu'un mode perfusion alimentée offre un bon compromis entre le rendement et la qualité du produit, puisqu'il permettait d'atteindre plus rapidement des titres élevés et ainsi de récolter le produit avec une galactosylation accru.

De manière générale, ce travail contribue de façon significative au développement et à l'optimisation des procédés de production des protéines recombinantes utilisant des systèmes

d'expression mammifères inductibles. Cette étude est la première à mettre en lumière l'impact de plusieurs conditions d'opération sur la performance des cultures (température de culture, mode de culture, régimes d'alimentation, densité cellulaire à l'induction, etc.), tant au niveau du rendement que de la qualité du produit. Ce travail apporte également des stratégies d'opération pour permettre l'induction efficace de cultures à haute densité cellulaire et ainsi maximiser les rendements.

ABSTRACT

Biotherapeutics represent today a fast-growing share of the global pharmaceutical market. Production yields have increased dramatically in recent decades due to significant improvements in bioprocess technologies and with the development of highly efficient expression systems. Mammalian cells remain the most widely-used expression platform, since they have the ability to perform post-translational modifications essential to the biological functions of recombinant proteins. CHO cells are the most commonly used host system for industrial biomanufacturing at large scale. Most often, the production of recombinant proteins is non-growth associated, which has led to the development of biphasic strategies whereby cells are rapidly grown to a high density followed by a production phase during which cell growth is stopped or reduced to increase the expression rate. In the same context, cell engineering has made it possible to regulate protein production with the development of inducible expression systems. Such systems offer the possibility to decouple the growth and production phases. Thus, culture conditions can be optimized for each phase independently. However, studies on process development for inducible system are almost non-existent in the current literature.

To achieve a good culture performance, it is important to select a culture mode that can support high cell density. Fed-batch and perfusion represent the most common operating modes for high cell density cultivation. Of the two, fed-batch remains the most widely-used in biomanufacturing due to its greater simplicity and ease of scaling. The major challenge in fed-batch or perfusion process development lies in the establishment of an efficient feeding strategies that can meet the cellular needs at each stage of the culture and minimize by-product accumulation. In this study, we aimed to optimize the production of recombinant rituximab by an inducible GS-CHO cell line through fed-batch and perfusion culture strategies.

First, we demonstrated that a fed-batch mode using a dynamic feeding strategy can lead to a 3-fold improvement in antibody yield compared to batch cultures. The impact of the timing of induction was assessed by testing a wide range of cell densities at induction. We showed that the product yield is negatively impacted when cultures are induced at either low or high cell density. We have also shown that the product glycan distribution is largely unaffected by the cell density at induction, but product galactosylation was found to decrease with culture duration.

Secondly, we evaluated the impact of different fed-batch strategies by comparing their performance for two cell densities at induction. We have also investigated the impact of

temperature reduction during the production phase. The supplementation of cultures from the beginning and the use of a moderate feeding rate were both favorable in terms of product yield. In flask and bioreactor, the highest product titers were achieved in cultures induced at high cell density with a temperature shift from 37 °C to 30 °C at the time of induction. Whereas, a reduction in the temperature was always beneficial, product glycan analysis revealed that the use of a physiological temperature during the growth phase is more favorable than mild hypothermia condition (34 °C).

Finally, we investigated the possibility to perform productive high cell density induction by implementing a hybrid culture strategy combining the advantages of fed-batch and perfusion modes. In shake flasks, full medium exchange carried out at the time of induction were shown to enhance culture productivity. Further improvement was achieved by combining repeated medium replacements and feeding of a concentrated nutrient solution during the growth phase and only feed the culture during the production phase. In bioreactor, we demonstrated that a fed-perfusion mode can provide a good trade-off between product yield and quality, as it allows to rapidly reach high product titer and to harvest cultures when product galactosylation is higher.

Taken together, this work contributes significantly to the development and optimization of cell culture processes involving inducible expression systems. This study is the first to shed light on the impact of several operating conditions on culture performance (temperature, culture mode, feeding regime, cell density at induction, etc.), both in terms of product yield and quality attributes. This work also presents strategies enabling productive high cell density induction.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT.....	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
LISTE DES ANNEXES	XXIV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Hypothèse et objectifs	2
1.3 Organisation de la thèse	2
1.4 Contributions scientifiques.....	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
2.1 Les protéines recombinantes : systèmes d’expression et marché mondial	5
2.2 Les CHO cellules hôtes pour la production industrielle	7
2.3 Les systèmes d’expression inductibles.....	8
2.4 La glycosylation des anticorps	9
2.5 Paramètres influençant la performance des cultures cellulaires.....	16
2.5.1 Conditions physico-chimiques	16
2.5.2 Milieu de culture	17
2.5.3 Déchets métaboliques.....	19
2.5.4 Modes de culture	22

2.6	Approches établies pour l'amélioration des rendements de culture.....	24
2.6.1	Le mode de culture cuvée-alimentée.....	24
2.6.1.1	Stratégies d'alimentation.....	24
2.6.1.2	Les procédés bi-phasiques.....	33
2.6.2	La perfusion comme alternative.....	38
CHAPITRE 3	MATERIELS ET MÉTHODES	42
3.1	Lignée cellulaire et conditions de culture	42
3.1.1	Maintenance des cellules.....	43
3.1.2	Cultures en flacons	44
3.1.3	Cultures en bioréacteur.....	45
3.2	Méthodes analytiques	45
3.2.1	Détermination de la concentration cellulaire et de la viabilité.....	45
3.2.2	Mesure des concentrations de glucose, lactate et ammoniacque	45
3.2.3	Méthodes de quantification des anticorps	46
3.2.4	Opération de purification des anticorps	46
3.2.5	Analyse de la distribution des glycanes	47
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : PROCESS DEVELOPMENT FOR AN INDUCIBLE RITUXIMAB-EXPRESSING CHO CELL LINE.....	48
4.1	Présentation de l'article	48
4.2	Abstract	49
4.3	Introduction	50
4.4	Materials and methods	52
4.4.1	Cell line and shake flask culture conditions.....	52
4.4.2	Bioreactor culture conditions	53
4.4.3	Analytical methods.....	54

4.4.4	Antibody quantification.....	54
4.4.5	Antibody purification	55
4.4.6	Glycan analysis by HILIC	55
4.4.7	Specific rates calculation.....	56
4.5	Results	57
4.5.1	Effect of the cell density at induction in batch cultures	57
4.5.2	Effect of the cell density at induction in fed-batch cultures.....	60
4.5.3	Scale-up to 2L bioreactor	65
4.5.4	Characterization of N-glycans distribution in shake flask and bioreactor	67
4.6	Discussion	71
4.7	Conclusion.....	77
4.8	Acknowledgements	77
4.9	Supplementary figures.....	78
4.10	References	80
CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : ASSESSMENT OF FED-BATCH CULTIVATION		
STRATEGIES FOR AN INDUCIBLE CHO CELL LINE		84
5.1	Présentation de l'article	84
5.2	Abstract	85
5.3	Introduction	86
5.4	Materials and methods	88
5.4.1	Cell line and culture media.....	88
5.4.2	Bioreactor cultures	89
5.4.3	Nutrients concentration, metabolites and product analyses	89
5.4.4	Antibody purification and glycan analysis.....	90
5.4.5	Average cell specific rates.....	90

5.5	Results	91
5.5.1	Effect of feeding start time on culture performance	91
5.5.2	Impact of the feeding rate on culture performance	96
5.5.3	Impact of the temperature shift at induction	100
5.5.4	High cell density induction in fed-batch bioreactors	104
5.5.5	Glycan distribution in bioreactor culture	107
5.6	Discussion	108
5.7	Conclusion.....	113
5.8	Acknowledgments	113
5.9	Supplementary figures.....	114
5.10	References	117
CHAPITRE 6 ARTICLE 3 : PROCESS INTENSIFICATION FOR THE PRODUCTION OF RITUXIMAB BY AN INDUCIBLE CHO CELL LINE		123
6.1	Présentation de l'article	123
6.2	Abstract	124
6.3	Introduction	125
6.4	Materials and methods	127
6.4.1	Cell line, culture medium and shake flask cultures.....	127
6.4.2	Bioreactor cultures	127
6.4.3	Viable cell, nutrient, metabolite and product analysis	128
6.4.4	Glycan distribution analysis	129
6.5	Results	129
6.5.1	Small-scale batch and fed-batch cultures with medium exchange at induction...	129
6.5.2	Small-scale cultures with different pre-induction feeding strategies	135
6.5.3	Product glycan distribution in shake flask cultures.....	138

6.5.4	Bioreactor cultures with different pre-induction feeding strategies.....	139
6.5.5	Glycan distribution in bioreactor cultures.....	141
6.6	Discussion	142
6.7	Conclusion.....	147
6.8	Acknowledgments.....	147
6.9	References	148
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	152
7.1	Le moment d'induction comme paramètre critique des cultures	153
7.2	Impact des stratégies sur le rendement des cultures.....	153
7.3	Impact des stratégies sur le profil de glycosylation du produit.....	156
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	162
BIBLIOGRAPHIE.....		166
ANNEXES.....		186

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Impact des principaux paramètres de cultures et de la composition du milieu sur la glycosylation (<i>Hossler et al., 2009</i>).....	15
Tableau 1.2 : Stratégies basées sur le maintien de bas niveaux en nutriments. Le ‘/’ signifie la non disponibilité d’information quant à certains paramètres.....	28
Tableau 1.3 : L’hypothermie et son impact sur l’évolution de la culture. Les conclusions tirées sont comparées aux cultures contrôles à 37 °C.....	35
Tableau 1.4 : Effet de la combinaison entre la réduction de la température et d’un autre paramètre de culture. Les cultures contrôles sont conduites à 37 °C sans aucune autre modification.....	37
Table 4.1 : Time of induction and duration of the production phase for cultures induced at various cell densities in batch and fed-batch	60
Table 4.2 : Cell specific rates evaluated 48h prior- and post-induction in batch cultures. Values are mean \pm SD from duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $P<0.05$ or ** $P<0.005$ compared to the batch culture with the highest product yield (induction at 1×10^6 cells/mL).	64
Table 4.3 : Cell specific rates evaluated 48h prior- and post-induction in fed-batch cultures. Values are mean \pm SD from duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $P<0.05$ or ** $P<0.005$ compared to the fed-batch culture with the highest product yield (induction at 2×10^6 cells/mL).....	64
Table 4.4 : Galactosylation and sialylation indexes (dpi: days post induction). Errors were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections.....	70
Table 5.1 : Cell specific rates in shake flask cultures with different feeding start times and induced at 4×10^6 and 10×10^6 cells/mL. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments	93
Table 5.2 : Cell specific rates in shake flask cultures with different feed rates and induced at 4×10^6 and 10×10^6 cells/mL. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments.	99
Table 5.3 : Cell specific rates in shake flask cultures with different temperature shifts. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments	103

Table 5.4 : Cell specific rates in high cell density induction fed-batch bioreactor cultures. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate measurements	106
Table 5.5 : Galactosylation (GI), sialylation (SI) and fucosylation (FI) indexes during high and low viability for fed-batch bioreactor cultures. Errors were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections.	108
Table 6.1 : Cell culture kinetics in shake flask batch cultures with different medium exchange volumes at induction. Values are mean \pm SD from duplicated cultures.	130
Table 6.2 : Cell specific rates in shake flask fed-batch cultures with different medium exchange volume. Values are mean \pm SD from duplicated measurements.....	131
Table 6.3 : Feeding strategies employed during shake flask cultures	136
Table B.1 : Densité cellulaire à l'induction pour les cultures cuvée et cuvée-alimentée.....	187

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Protéines recombinantes approuvées par la FDA entre 2011-2016 (a) et leur distribution par classe de protéines (b) (<i>Lagassé et al., 2017</i>).....	6
Figure 2.2 : Mécanisme d'action d'un anticorps thérapeutique (<i>Suzuki, Kato, & Kato, 2015</i>). La représentation structurale d'une IgG est schématisée dans le rectangle en haut à droite (<i>Zafir-Lavie et al., 2007</i>).....	11
Figure 2.3 : (A) Structures des N-glycans. La partie commune est délimitée par les pointillés. Des résidus fucose peuvent venir se fixer sur le GlcNAc de la partie commune ou de l'antenne (<i>Rosenlöcher, 2015</i>). (B) Représentation du processus de glycosylation (<i>Schwarz & Aebi, 2011</i>).....	12
Figure 2.4 : Métabolisme simplifié d'une cellule de mammifère.....	19
Figure 2.5: Représentation schématique des différents modes de culture : (A) cuvée, (B) cuvée-alimentée, (C) chémostat et (D) perfusion (M. C. F. Dalm, 2007).	22
Figure 3.1: Le système inductible au cumate (Poulain et al., 2017)	42
Figure 4.1:Viable cell concentration and cell viability profiles in batch (A, C) and fed-batch cultures (B, D). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (circle), 4×10^6 cells/mL (diamond), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square). Arrows indicate the induction time. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.	59
Figure 4.2 : Glucose and lactate concentrations profiles in batch (A, B) and fed-batch cultures (D, E). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (circle), 4×10^6 cells/mL (diamond), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square). Final ammonia concentrations (C) and final monoclonal antibody production (F) for batch (grey bars) and fed-batch cultures (black bars). Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $**p < 0.005$	63
Figure 4.3: Cell viability and cell density (A), glucose and lactate concentrations (B), antibody and cell specific productivity (C) and ammonia (D) concentrations during a 2L bioreactor fed-batch culture. Empty and solid circles correspond to cell viability and viable cell	

concentration, respectively. Empty and solid squares to glucose and lactate concentrations, respectively. The arrow indicates the time of induction. The solid line corresponds to the antibody concentration (arrow to left-hand axis) and the dashed line to the cell specific productivity (arrow to right-hand axis). Error bars represent standard deviations of duplicate samples from the bioreactor.66

Figure 4.4 : Glycan distribution profile in shake flask fed-batch cultures. Samples from the culture induced at 4×10^6 cells/mL were taken at 9 dpi and 11 dpi. Samples from the culture induced at 10×10^6 cells/mL were taken at 7 dpi and 9 dpi. In both cases, the first sampling point corresponded to high cell viability conditions and the second sample corresponded to the culture harvest. Error bars depict standard deviations of duplicate injections.68

Figure 4.5 : Evolution of the glycan distribution profile during a fed-batch bioreactor culture. Error bars depict standard deviations of duplicate injections.69

Figure 4.6 : Galactosylation index as a function of cell viability during the bioreactor run. Error bars were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections. ..70

Figure 5.1 : Cell density (A & B) and cell viability (C & D) profiles for fed-batch cultures with different feeding starting times. Feeding was initiated pre-induction (triangles), at the time of induction (circles) and post-induction (squares), corresponding to 24h, 96h and 120h, respectively. Solid symbols represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. The dash lines indicate the timing of induction and the arrows indicate the onsets of feeding. The temperature was shifted from 37 °C to 34 °C at the time of induction. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. .92

Figure 5.2 : Glucose (A & B) and lactate (C & D) profiles for fed-batch cultures with different feeding starting times. Feeding was initiated pre-induction (triangles), at the time of induction (circles) and post-induction (squares), corresponding to 24h, 96h and 120h, respectively. Final ammonia (E) and antibody (F) concentrations. Solid symbols and grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. The dash lines indicate the timing of induction. The temperature was shifted from 37 °C to 34 °C at the time of induction. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $*p < 0.05$, $**p < 0.005$95

Figure 5.3 : Integral of viable cell (A), cumulative feed volume (B), glucose (C), lactate (D), final ammonia concentration (E) and final antibody concentration (F) in fed-batch cultures with different feed rates. Cultures were operated at low (circles), intermediate (triangles) and high (squares) feed rates, corresponding to glucose set-points of 25 mM, 35 mM and 50 mM, respectively. Solid symbols and grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $*p < 0.05$, $**p < 0.005$97

Figure 5.4 : Integral of viable cell concentration and antibody concentration in batch (A & C) and fed-batch (B & D) cultures with different temperature shifts at induction. Grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cell/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $*p < 0.05$, $**p < 0.005$ 101

Figure 5.5 : Time profiles of viable cells (A), antibody (B), glucose (C) and lactate (D) concentrations in fed-batch bioreactor cultures operated at 37 °C (solid symbols) and 34°C (open symbols) during the growth phase pre-induction. Arrows indicate the timing of induction, corresponding to a cell density of 10×10^6 cells/mL. The temperature was reduced to 30 °C at induction. Error bars represent standard deviations of duplicate samples.105

Figure 5.6 : Glycan distribution profile in fed-batch bioreactor cultures induced at high cell density. Samples were collected when high viability conditions were prevailing (11 dpi for the 37-30 culture and 10 dpi for the 34-30 culture) and at harvest (14 dpi for the 37-30 culture and 13 dpi for the 34-30 culture). Error bars depict standard deviations of duplicate injections. ...107

Figure 6.1 : Schematic illustration of the culture system with continuous perfusion of basal medium and daily bolus additions of a concentrated feed solution128

Figure 6.2 : Time profiles of viable cell density and cell viability in batch (A, C) and fed-batch cultures (B, D) performed with different proportions of medium exchange at the time of induction: 0% (triangle), 25% (circle), 50% (square), 75% (diamond) and 100% (cross). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch cultures. Dashed lines indicate the time at which medium exchange, culture induction and temperature switch to mild hypothermia were concomitantly performed. Error bars depict SD from duplicate cultures.132

Figure 6.3 : Glucose and lactate concentrations in batch (A & C) and fed-batch cultures (B& D).

Medium exchanges were performed by replacing increasing fractions of the culture volume with fresh media: 0% (triangle), 25% (circle), 50% (square), 75% (diamond) and 100% (cross). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Final ammonia concentrations (E) and final monoclonal antibody production (F) for batch (grey bars) and fed-batch cultures (black bars). Dashed lines indicate the time at which medium exchange, culture induction and temperature switch to mild hypothermia were concomitantly performed. Error bars depict SD from duplicate cultures. 135

Figure 6.4 : Cell concentration (A), cell viability (B), glucose (C) and lactate (D) concentration profiles, final ammonia (E) and final antibody (F) concentrations in shake flask cultures operated with different feeding regimes: fed-batch cultures (squares and white bars), perfusion cultures (triangles and grey bars) and fed-perfusion cultures (circles and black bars). The arrow indicates the time of induction. Errors depict standard deviation of duplicate experiments. 137

Figure 6.5 : Glycan profiles in shake flask cultures. HILIC analysis was performed on samples at harvest days which correspond to 9, 12, 12 dpi for respectively fed-batch (white bar), perfusion (grey bar) and fed-perfusion (black bar) cultures. 139

Figure 6.6 : Cell concentration (A), cell viability (B), glucose and lactate (C) concentration profiles, final ammonia concentration (D) antibody concentration (E) and cell specific productivity (F) in bioreactor cultures operated with different feeding regimes: fed-batch cultures (squares and white bars), perfusion cultures (triangles and grey bars) and fed-perfusion cultures (circles and black bars). The arrow indicates the time of induction. Errors depict standard deviation of duplicate experiments. 141

Figure 6.7 : Glycan distribution in bioreactor cultures operated with different feeding regime during the production phase: fed-batch, perfusion and fed-perfusion cultures. For each bioreactor, samples were collected on day 11 under high cell viability conditions and at culture harvest (day 16, 18 and 19 for fed-batch, low rate perfusion and fed-perfusion, respectively). 142

Figure A.1: Profil de croissance cellulaire en mode perfusion-alimentée. Deux stratégies de changement de milieu ont été effectuées : à chaque jour (A) et à chaque deux jours (B). Les symboles pleins représentent les cultures perfusées de manière journalière et les symboles vides

celles perfusées à chaque deux jours. Les différents taux de perfusion réalisés sont: 20% (cercle), 50% (triangle) et 100% (carré).....186

Figure B.1 : Viable cell concentration profiles in batch (A) and fed-batch cultures (B). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (diamond), 4×10^6 cells/mL (circle), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square).....187

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
BHK	Cellules de rein de bébé hamster (<i>Baby hamster kidney</i>)
CDC	Cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (<i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CO ₂	Dioxyde de carbone
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
<i>E. Coli</i>	Escherichia Coli
EPO	Erythropoïétine
Fc	Fragment cristallisable des anticorps
FcγR	Récepteur Fc-gamma
FDA	Food and Drug Administration
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
GLUT	Transporteur de glucose
GS	Glutamine synthétase
HEK293	Cellules de rein embryonnaire humain (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
IgG	Immunoglobuline G
LDH	Lactate déshydrogénase
mAb	Anticorps monoclonal

MFA	Analyse de flux métaboliques
NH ₄ ⁺	Ion ammonium
NK	Cellules <i>Natural Killer</i>
NS0	Cellules de myélome murin
OUR	Taux d'oxygène consommé (<i>Oxygen uptake rate</i>)
PER.C6	Cellules de rétine humaine
PYC	Pyruvate carboxylase
RE	Réticulum endoplasmique
SEAP	Alkaline phosphatase embryonique secretée (<i>Secreted embryonic alkaline phosphatase</i>)
Sp2/0	Cellules murines
TCA	Cycle d'acides tricarboxyliques
TNFR	Récepteur de facteurs de tumeur nécrosée (<i>Tumor necrosis factor receptor</i>)
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
UDP-Glc	Uridine diphosphate glucose
Y(L/G)	Ratio de lactate produit par rapport au glucose consommé

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Possibilité d’induction à haute densité cellulaire.....	186
Annexe B – Figure supplémentaire de la concentration cellulaire en fonction des jours post induction.....	187

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Problématique

De nos jours, le cancer dans toutes ses formes se révèle être selon les statistiques ce qu'on appelle : «la maladie du siècle» (Ferlay et al., 2015). Pour le traitement et en dépit de ses nombreux effets secondaires, on disposait jusqu'alors de la chimiothérapie. Par ailleurs, une des révolutions de ces deux dernières décennies en matière médicale est l'introduction de l'immunothérapie comme traitement de plusieurs maladies, plus particulièrement le cancer. Cet engouement pour le marché des biomolécules a permis d'innombrables percées technologiques grâce à l'acquisition et au développement des connaissances autour de la cellule et de ses différentes manipulations. En effet, la demande croissante en protéines recombinantes à moindre coût ainsi que les faibles rendements de production ont poussé l'industrie à améliorer les procédés de culture cellulaire ainsi qu'à concevoir des systèmes d'expression de plus en plus performants. De nos jours, la culture de cellules de mammifères fournit la majorité des produits biopharmaceutiques se trouvant sur le marché tels que les anticorps, les interférons, les hormones, les facteurs de coagulation et les vaccins (Figuert, 2010). Ces cellules sont souvent identifiées comme le système hôte le plus approprié pour la production de protéines recombinantes présentant des modifications post-traductionnelles similaires à celles retrouvées chez l'humain (Wurm, 2004). Le développement de ces produits biologiques est en partie dû aux efforts de l'ingénierie afin d'améliorer la productivité et l'efficacité des procédés. Des concentrations en protéines allant de 5 à 10 g/L (Y. M. Huang et al., 2010) ont été atteintes notamment grâce au développement et à l'amélioration des vecteurs d'expression, à une meilleure sélection de lignées cellulaires à haute production, à une meilleure formulation des milieux et au développement des procédés cuvée-alimentée et perfusion opérant à haute densité cellulaire. En outre, les progrès de l'ingénierie cellulaire ont également conduit à la mise au point de systèmes de promoteurs inductibles, tels que les systèmes «gène-interrupteur» basés sur le cumate (Mullick et al., 2006). Un tel système d'expression confère l'avantage de pouvoir optimiser de manière indépendante les phases de croissance et de production. Par ailleurs, peu d'information est disponible dans la littérature en ce qui a trait au développement de procédés de culture cellulaire impliquant des systèmes d'expression inductibles et aux stratégies d'opération pour améliorer les rendements de production.

1.2 Hypothèse et objectifs

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectif de vérifier les hypothèses suivantes :

- Le moment d'induction est un paramètre critique à prendre en compte dans le développement d'un procédé de culture cuvée-alimenté car il a un impact déterminant sur le rendement et la qualité du produit.
- Il est possible d'améliorer significativement les rendements de culture tout en préservant la qualité du produit en mode cuvée-alimenté en optimisant le régime d'alimentation et la température durant les phases de croissance et de production
- L'application d'un mode perfusion pendant la phase de croissance permet d'induire efficacement les cultures à haute densité cellulaire sans compromettre la qualité du produit

Ainsi, l'objectif général de ce travail consistait à augmenter la productivité des cultures à base d'une lignée cellulaire inductible grâce à l'établissement de stratégies d'opération en mode cuvée-alimentée ou perfusion. Les recherches se sont organisées autour des objectifs spécifiques suivants:

- Développer un procédé de culture en mode cuvée-alimentée en déterminant un moment propice pour l'induction et une stratégie d'alimentation efficace.
- Déterminer des conditions de culture favorisant la productivité des cultures en mode cuvée-alimentée et en évaluer l'impact sur la qualité du produit.
- Développer un mode de culture hybride (cuvée-alimentée/perfusion) permettant l'induction à haute densité cellulaire et la production à haut rendement.

1.3 Organisation de la thèse

Le premier chapitre de la thèse comporte une mise en contexte exposant la problématique à laquelle on fait face concernant les systèmes inductibles et le manque d'informations dans un contexte de développement de stratégies d'opération. Le chapitre 2 présente une revue critique de la littérature des différentes approches pour améliorer les rendements des procédés de culture cellulaire. Cette revue présente dans un premier temps ce qui caractérise le domaine de la culture cellulaire, les systèmes d'expressions et rapporte dans un deuxième temps les stratégies les plus

employées pour optimiser les performances de culture incluant l'emploi des modes cuvée-alimentée, perfusion ainsi que les stratégies bi-phasiques. Les démarches expérimentales et les méthodes analytiques employées dans le cadre de cette thèse sont présentées dans le chapitre 3. Les chapitres 4, 5 et 6 sont constitués des différents articles soumis dans des journaux scientifiques. Dans le premier article intitulé ***'Développement d'un procédé de culture pour un système CHO inductible'***, nous avons démontré les améliorations que procure le mode cuvée-alimentée au niveau du rendement final en protéines recombinantes et également mis en lumière l'impact de la densité cellulaire à l'induction sur les performances des cultures. Le deuxième article ***'Développement de stratégies de culture cuvée-alimentée afin d'améliorer les performances d'un système CHO inductible'*** présente quant à lui l'impact de différentes stratégies de culture sur le rendement et la qualité du produit pour un mode cuvée-alimentée. Dans le dernier article ***'Intensification d'un procédé de culture cellulaire pour la production de rituximab'*** présenté dans cette thèse, nous avons développé des stratégies de culture permettant l'induction à haute densité cellulaire. Enfin, le chapitre 7 comporte une discussion générale de l'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse. La conclusion et des recommandations pour des travaux futurs sont présentées dans le chapitre 8.

1.4 Contributions scientifiques

Les études effectuées dans le cadre de cette thèse représentent, à notre connaissance, les premières à s'être penchées sur l'impact de différentes stratégies de culture pour un système inductible. Les contributions majeures de cette thèse sont :

- La mise en lumière de l'impact critique que peut avoir la densité cellulaire à l'induction sur la performance des cultures en modes cuvée et cuvée-alimentée
- La démonstration qu'une alimentation dynamique appliquée avant et après l'induction permet d'améliorer le rendement de production pour un système inductible
- La démonstration que l'emploi d'une température physiologique lors de la croissance et de conditions légèrement hypothermiques pendant la production sont favorables à la productivité des cultures en terme de rendement
- La mise en place en bioréacteur d'un mode d'opération hybride (perfusion et cuvée-alimentée) permettant d'induire efficacement les cultures à haute densité cellulaire tout en préservant la qualité du produit

- La caractérisation du profil de glycans en fonction de la densité cellulaire à l'induction et pour différentes conditions d'opérations.

Ces contributions sont pertinentes compte tenu de l'intérêt croissant pour les systèmes d'expression inductibles et de l'importance des cellules CHO en tant que plateforme d'expression. Les résultats présentés fournissent des informations importantes pouvant guider l'optimisation rationnelle des procédés de culture utilisant un système mammifère inductible.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Les protéines recombinantes : systèmes d'expression et marché mondial

Les cellules du corps humain produisent une multitude de protéines complexes accomplissant chacune des fonctions essentielles et précises en tant que catalyseurs, agents de signalisation ou composants structuraux. Leur absence ou leur dysfonctionnement provoquent l'apparition de diverses pathologies chez l'homme. Les industries pharmaceutiques se sont alors penchées sur la production *ex vivo* et l'administration de ces protéines aux patients après les traitements nécessaires. A cet effet, différents systèmes d'expression ont été employés depuis l'émergence de ce marché (Assenberg, Wan, Geisse, & Mayr, 2013; Demain & Vaishnav, 2009).

Les bactéries, particulièrement *Escherichia Coli*, ont été l'un des premiers systèmes employés et restent encore largement utilisées dans diverses productions à ce jour (C.-J. Huang, Lin, & Yang, 2012; Terpe, 2006). Elles présentent plusieurs avantages, notamment une croissance rapide et la capacité d'exprimer une protéine d'intérêt à de hautes concentrations. En effet, l'accumulation de protéines recombinantes chez les *E. coli* peut représenter jusqu'à 80 % de son poids sec (Demain & Vaishnav, 2009). Les levures sont également utilisées pour la production de certaines protéines recombinantes (Çelik & Çalık, 2012; Fernandez & Vega, 2013). Tout comme *E. Coli*, leur génome est bien caractérisé et leur utilisation dans un contexte de biofabrication demeure relativement peu coûteuse (White, 2010). Par ailleurs, certaines protéines doivent posséder des repliements et des modifications post-traductionnelles essentiels pour assurer leur stabilité et leur fonction, ce que la machinerie microbienne n'est pas toujours en mesure de réaliser (Assenberg et al., 2013; Saccardo, Corchero, & Ferrer-Mirallès, 2016). D'autres systèmes d'expression sont également utilisés, on cite par exemple les cellules d'insectes (Drugmand, Schneider, & Agathos, 2012) qui peuvent produire jusqu'à 11 g/L (Demain & Vaishnav, 2009) de protéines recombinantes avec des modifications post-traductionnelles plus accomplies comparées aux systèmes précédents (Drugmand et al., 2012). Un bon nombre d'investigations se sont également intéressées aux cellules de plantes (Lalonde & Durocher, 2017; Sabalza, Christou, & Capell, 2014). Cependant, pour ces deux derniers systèmes, certaines limitations demeurent encore en raison des faibles rendements, de la variabilité de leur génome et de la présence de certains profils de glycosylation absents chez l'homme (Demain & Vaishnav, 2009).

Compte tenu du fait que la majorité des protéines thérapeutiques présentent au moins une modification post-traductionnelle qui influence grandement ses propriétés biochimiques et thérapeutiques *in vivo*, les cellules de mammifères représentent alors la plateforme la plus appropriée pour réaliser efficacement ces modifications. Cet avantage unique l'emporte sur la complexité, la durée et les coûts de production associés à la culture de cellules de mammifères, lorsque comparée aux systèmes bactériens. Durant la dernière décennie, plus de 50% des protéines recombinantes ont été produites dans les systèmes mammifères (Walsh, 2010). Depuis 2011, la FDA (*Food and Drug Administration*) a homologué 62 protéines recombinantes issues de culture de cellules de mammifères dont 48% représentant des anticorps monoclonaux (voir Figure 2.1) (Lagassé et al., 2017).

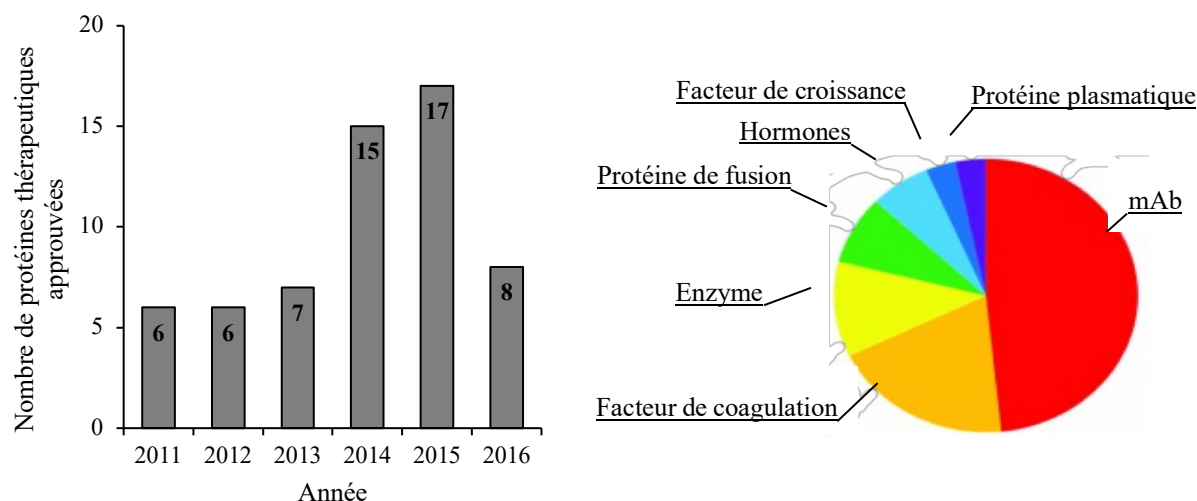


Figure 2.1 : Protéines recombinantes approuvées par la FDA entre 2011-2016 (a) et leur distribution par classe de protéines (b) (Lagassé et al., 2017).

En raison de la demande croissante en produits biopharmaceutiques, les productions spécifiques et volumétriques ont été multipliées par 20 ces dernières années grâce aux efforts consacrés à l'optimisation des milieux et des méthodes de culture. Durant les années 1980, une production typique pouvait atteindre des concentrations cellulaires de l'ordre de 1 à 2×10^6 cells/mL avec une concentration finale en protéine entre 50 et 100 mg/L (Wuest, Harcum, & Lee, 2012). De nos jours, les procédés de production permettent un rendement allant de 5 à 10 g/L (Hacker, De Jesus, & Wurm, 2009; Y. M. Huang et al., 2010). Ce gain peut être attribué à l'optimisation des techniques de sélection et d'identification d'un phénotype optimal, ainsi qu'à l'amélioration des stratégies

d'alimentation et des conditions opératoires (température, pH, pression osmotique, etc.). De plus, la caractérisation de la majorité des voies métaboliques a permis de mieux cerner les besoins cellulaires en culture. Depuis la commercialisation de la première protéine recombinante OKT (*ornithine aminotransferase*) en 1986, le marché des protéines recombinantes ne cesse d'évoluer de manière exponentielle. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés tels que les protéines de fusion, les fragments d'anticorps ou les anticorps conjugués représentent à ce jour la classe de produits prédominante du marché biopharmaceutique (Elvin, Couston, & van der Walle, 2013). On évalue à 75 milliards de dollars US le revenu global des ventes d'anticorps en 2013, soit une augmentation d'environ 90% depuis l'année 2008 (Walsh, 2014). Avec plus de 300 nouveaux anticorps en cours de développement, le marché pourrait atteindre 125 milliards de dollars d'ici 2020. Sur les 44 anticorps monoclonaux existant actuellement sur le marché, seulement 3 sont produits dans *E. coli* alors que les autres sont tous issus de cultures de cellules de mammifères (Ecker, Jones, & Levine, 2015).

Les cellules HEK 293 ont été les premières cellules humaines transformées pour la production de glycoprotéines relativement semblables à celles produites chez l'homme et assurant une immunogénicité pratiquement nulle lors de l'introduction au patient (Swiech, Picanço-Castro, & Covas, 2012). D'autres lignées cellulaires humaines sont en phase de développement préclinique ou clinique pour la production de glycoprotéines. On cite les PER.C6 (Soo Min Noh, Sathyamurthy, & Lee, 2013), générées à partir de cellules rétino-blastes et qui peuvent croître en suspension à haute densité cellulaire (jusqu'à 10^7 cells/mL) dans un milieu sans sérum également. Les rendements en IgG varient entre 300-500 mg/L (Bandaranayake & Almo, 2014). Parmi les autres lignées mammifères employées dans les bioprocédés, on retrouve les BHK (Baby Hamster Kidney) (Birch & Racher, 2006; Hu Zhang, Wang, Quan, & Fan, 2010) qui sont généralement cultivées pour la production de vaccins (Dumont, Euwart, Mei, Estes, & Kshirsagar, 2016). Les cellules murines de myélomes (NS0 and Sp2/0) quant à elles sont utilisées pour la production de certains anticorps monoclonaux pour le traitement de divers cancers. En revanche, ces cellules peuvent donner lieu à des glycanes qui provoquent des réactions immunitaires dans certains cas (Lalonde & Durocher, 2017).

2.2 Les CHO cellules hôtes pour la production industrielle

De nos jours, la lignée de cellules de mammifères la plus communément utilisée reste les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO pour *Chinese Hamster Ovary*) qui sont utilisées pour

généraliser la très grande majorité des protéines recombinantes se trouvant sur le marché (Jayapal, Wlaschin, Hu, & Yap, 2007). En 2016, la moitié des bioproduits approuvés par la FDA étaient issus de lignées CHO (FDA, 2016). Isolées dans les années 1950 (Hansen, Pristovšek, Kildegaard, & Lee, 2017; Puck, Cieciura, & Robinson, 1958), ces cellules se sont révélées robustes en culture. De plus, leur habilité à croître en suspension dans un milieu de culture sans sérum fait de ces cellules un système hôte de choix pour la production industrielle à grande échelle (J. Y. Kim, Kim, & Lee, 2012; Soo Min Noh et al., 2013). Elles ont une bonne résistance aux forces de cisaillement, sont tolérantes aux changements de conditions de culture, et présentent des temps de génération relativement courts. D'autre part, elles possèdent une bonne capacité à synthétiser des protéines complexes et à croître à haute densité dans les bioréacteurs. La faculté à produire des glycoprotéines avec des modifications post-traductionnelles proches des cellules humaines ainsi que la sensibilité réduite aux nombreux gènes viraux minimisent les risques de biosécurité lors des productions commerciales (Lalonde & Durocher, 2017). De plus, ce sont des candidates intéressantes pour les diverses manipulations génétiques, comme la transfection (Cacciatore, Chasin, & Leonard, 2010). Par ailleurs, chaque production nécessite la sélection d'un clone présentant les propriétés phénotypiques adéquates, y compris la qualité de la protéine produite, le temps de dédoublement et la viabilité à long terme face aux conditions de culture. De ce fait, même lorsqu'un clone de production a été identifié, la dérive phénotypique n'est pas rare (Bandaranayake & Almo, 2014). Aussi, les cellules CHO sont incapables d'exprimer certaines formes de glycosylation (Patnaik & Stanley, 2006) et/ou tout au contraire, elles synthétisent des glycans qui n'existent pas chez les humains, et qui même à de très faibles niveaux, peuvent provoquer dans certains cas une réaction immunitaire (Bosques et al., 2010). Plusieurs anticorps monoclonaux commercialisés sont produits à partir des CHO. On cite; SYLVANT[®], PERJETA[®] et le RITUXAN[®] (Lalonde & Durocher, 2017).

2.3 Les systèmes d'expression inductibles

Il peut être avantageux de contrôler le moment de production d'une protéine recombinante, ce qui peut être fait par l'utilisation de systèmes d'expression inductibles. Le recours à de tels systèmes est notamment envisagé lorsque la protéine produite s'avère cytotoxique pour les cellules (A Rita Costa, Rodrigues, Henriques, Azeredo, & Oliveira, 2010). Les systèmes inductibles offrent

ainsi un commutateur génétique qui permet l'expression (ou la répression) d'une protéine recombinante en réponse à la présence (ou l'absence) d'un régulateur spécifique et non toxique. Parmi les systèmes les plus communément utilisés, on trouve ceux basés sur la tétracycline (Forster et al., 1999; Gossen & Bujard, 1992; Lam et al., 2017; Misaghi, Chang, & Snedecor, 2014) et l'ecdysone (No, Yao, & Evans, 1996). Plus récemment, un système inductible au cumate a été développé (Mullick et al., 2006). Ce dernier comprend un site du promoteur régulateur lié directement au gène de la protéine d'intérêt dont l'expression est contrôlée par l'addition d'un agent non toxique dans le milieu de culture : le cumate.

Dans une perspective de développement de procédé, les systèmes inductibles offrent également un avantage majeur, celui de pouvoir contrôler la transition entre les phases de croissance et de production, et ainsi fixer des conditions opératoires propices à chacune d'entre elles. Le moment d'induction, qui délimite les phases de croissance et de production, est un paramètre crucial. En effet, il a été démontré que le temps d'induction peut avoir un impact marqué sur la productivité spécifique de cellules CHO (Zahra Sheikholeslami, Jolicoeur, & Henry, 2013a). De leur côté, Gaillet et al. (Gaillet et al., 2007; Gaillet et al., 2010) ont montré l'efficacité du système inductible au cumate en exprimant diverses protéines (SEAP, EPO, etc.) avec la possibilité de coupler l'induction avec une transduction stable suite à l'insertion d'un vecteur lentivirus ou adénovirus. La portée d'un modèle cinétique développé par le groupe de Ghorbaniaghdam et al. (Ghorbaniaghdam, Chen, Henry, & Jolicoeur, 2014) sur une lignée CHO parentale a été étendue de façon à décrire le métabolisme cellulaire de deux clones CHO inductibles au cumate présentant des niveaux d'expression différents. Les résultats de simulation ont montré que la distribution des flux métaboliques diffère dans les réactions impliquant le métabolisme du pyruvate avec un important flux du pyruvate vers le cycle TCA pour le clone présentant le meilleur taux d'expression.

En dépit des quelques études mentionnées ci-haut, force est de constater que très peu d'informations sont disponibles quant au développement de procédés et de stratégies de culture spécifiques aux systèmes inductibles.

2.4 La glycosylation des anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines (Ig) produites par les lymphocytes B. Ils sont dits monoclonaux lorsqu'ils proviennent du même clone de lymphocyte et polyclonaux pour ceux issus de plusieurs clones. De nature glyco-protéinique, les anticorps monoclonaux sont composés de

deux chaînes polypeptidiques lourdes (50kDa chaque) et de deux chaînes légères de 25kDa chacune (Figure 2.2). L'avantage d'utiliser des anticorps thérapeutiques réside dans leur capacité à se lier spécifiquement à un antigène donné par leur région variable et déclencher ainsi une réponse immunitaire. Certains anticorps thérapeutiques neutralisent les fonctions pathologiques de la molécule cible en se liant à un ligand ou à un récepteur exprimé sur la surface de la cellule, bloquant ainsi les voies de signalisation. Par conséquent, la prolifération de la cellule est inhibée et le programme pro-apoptotique activé (Buss, Henderson, McFarlane, Shenton, & de Haan, 2012). D'autre part, les domaines variables de l'anticorps monoclonal peuvent se lier à un antigène spécifique exprimé sur la surface de la cellule cible. Cette action permet à l'anticorps de faire appel à des cellules immuno-effectrices (comme les macrophages ou les cellules NK) qui se fixent sur son domaine constant et déclenchent une lyse de la cellule cible, un mécanisme communément appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). La cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC pour *complement dependent cytotoxicity*) est quant à elle déclenchée lorsque le complexe C1 se lie au complexe anticorps-antigène pour activer une cascade de protéines compléments qui attaquent la membrane et provoquent la lyse de la cellule cible (Hossler, Khattak, & Li, 2009; Zafir-Lavie, Michaeli, & Reiter, 2007).

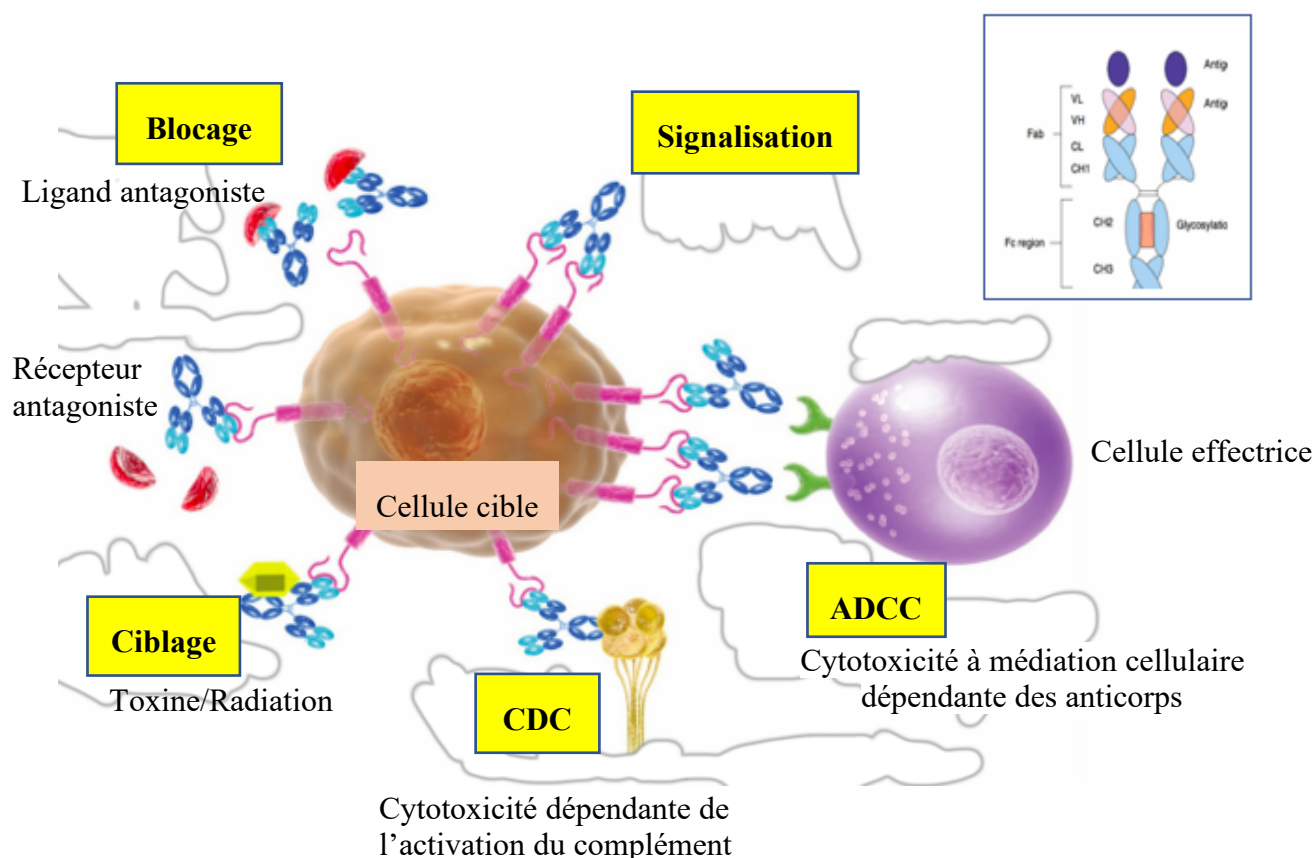


Figure 2.2 : Mécanisme d'action d'un anticorps thérapeutique (*Suzuki, Kato, & Kato, 2015*). La représentation structurale d'une IgG est schématisée dans le rectangle en haut à droite (*Zafir-Lavie et al., 2007*)

L'ADCC et le CDC sont des interactions impliquant des composants du système immunitaire et, parmi les anticorps thérapeutiques développés, certains utilisent plus d'un mécanisme (ADCC, CDC, et les fonctions neutralisantes). Les anticorps peuvent également être conjugués à des toxines, des cytokines ou des radio-isotopes permettant une livraison directe et à haute concentration de l'agent cytotoxique sur le tissu tumoral, préservant ainsi les cellules saines (*Suzuki et al., 2015*).

La synthèse protéique est un processus aujourd'hui mieux connu, dont les dernières étapes sont caractérisées par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Parmi ces étapes, la glycosylation des protéines joue un rôle important dans la détermination des fonctions effectrices de l'anticorps (les cinétiques de réaction, la solubilité, le temps de demi-vie/ temps de résidence de la protéine d'intérêt *in vivo* ainsi que la fixation aux récepteurs (*Jenkins & Curling, 1994*). La présence d'un patron de glycosylation spécifique participe également au maintien de la structure quaternaire de l'anticorps. Étant donné que les anticorps thérapeutiques sont majoritairement des IgG, on parlera dans ce qui suit de la glycosylation de cette classe. En effet, on retrouve sur chaque région CH2 un site de N-glycosylation hétérogène au niveau de l'asparagine 297. La présence de différents sucres terminaux est à l'origine de cette hétérogénéité. La présence d'acide sialique, de fucose, de N-acétyl-glucosamine et de mannose influencent les liaisons anticorps-récepteurs, par conséquent l'ADCC. Le terminal galactose quant à lui affecte la liaison IgG-C1q et donc le CDC (*Raju, 2008*).

Tous les N-glycans partagent une structure de base composée de deux N-acétyl glucosamine (GlcNAc) et 3 résidus mannose. La fixation d'un monosaccharide additionnel permet de classer les N-glycans (Figure 2.3A). Les N-glycans complexes sont caractérisés par une combinaison variée de monosaccharides contrairement aux N-glycans hautement mannosylés. La diversité des sous-classes de N-glycans peut d'autant plus augmenter en spécifiant la fixation partielle ou complète d'acide sialique sur les terminaisons galactose (*Goldberg, Bern, North, Haslam, & Dell, 2008; Sha, Agarabi, Brorson, Lee, & Yoon, 2016*).

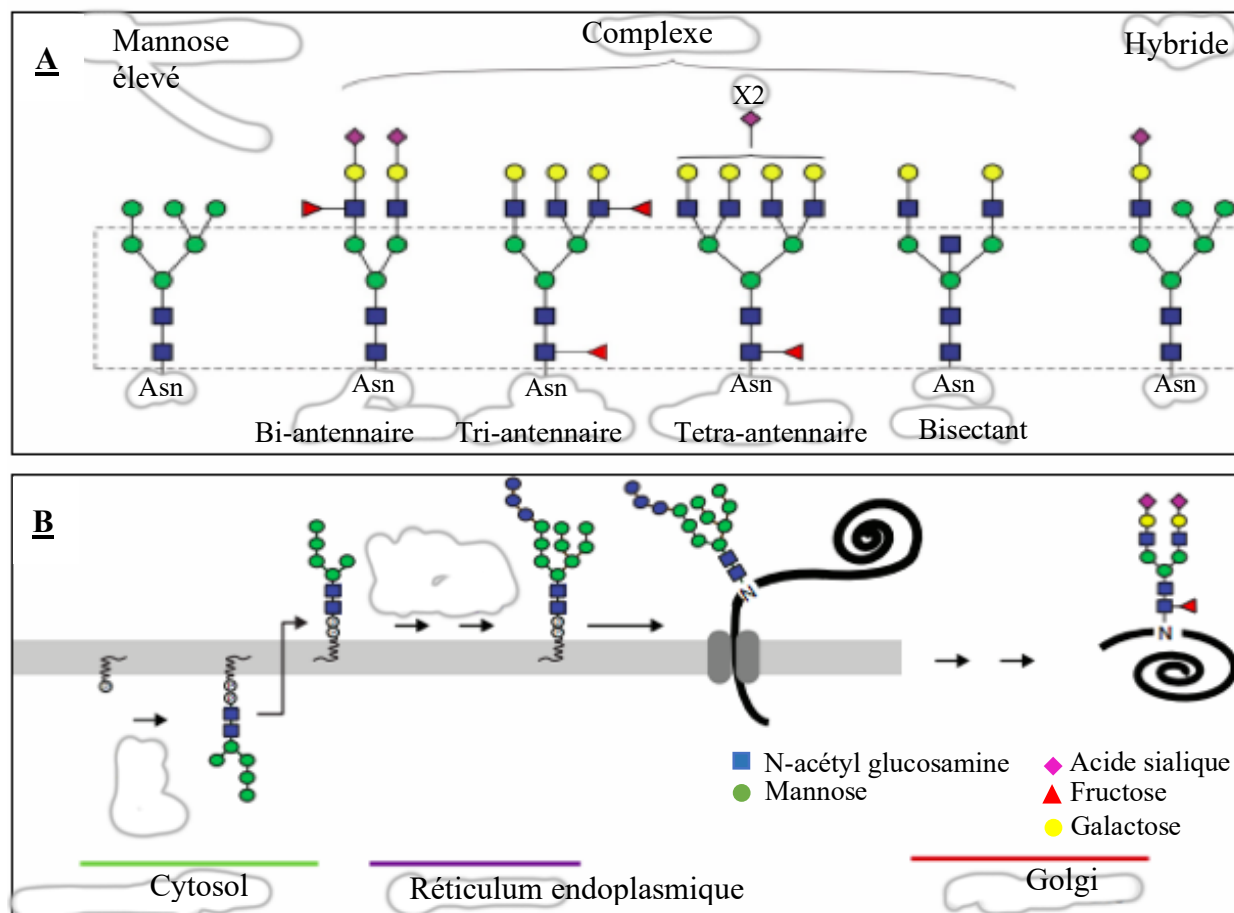


Figure 2.3 : (A) Structures des N-glycans. La partie commune est délimitée par les pointillés. Des résidus fucose peuvent venir se fixer sur le GlcNAc de la partie commune ou de l'antenne (Rosenlöcher, 2015). (B) Représentation du processus de glycosylation (Schwarz & Aebi, 2011)

Pour les cellules eucaryotes, la biosynthèse des N-glycans commence dans le cytoplasme où les précurseurs d'oligosaccharides sont assemblés dans le réticulum endoplasmique rugueux (RE) (Spiro, 2002). Les donneurs de sucres nucléotidiques (comme l'uridine diphosphate UDP-GlcNAc ou le l'UDP-Glc) fournissent les unités de monosaccharides activées. Séquentiellement, deux résidus GlcNAc et cinq unités de mannose sont ajoutés via des glycosyl-transférases spécifiques. Les étapes faisant appel aux glycosyl-transférases définissent alors la préférence quant au substrat pour bâtir une structure glycanique unique (Burda, Jakob, Beinhauer, Hegemann, & Aebi, 1999). S'en suit une translocation du fragment de sucre vers le coté luminal du RE via une catalyse enzymatique faisant intervenir une lipase (Sanyal & Menon, 2009). Puisque le RE ne possède pas de transporteurs de nucléotides-sucre, des donneurs de monosaccharides sont également transférés

dans le RE luminal afin de former le précurseur oligosaccharide final. Un complexe de protéines oligosaccharyl-transférases (OST) catalyse alors le transfert du précurseur de glycans à la protéine receveuse suivant une liaison covalente à un résidu Asn (Nilsson & Von Heijne, 1993). S'en suit une multitude de réactions enzymatiques visant à la modification séquentielle de l'oligosaccharide. L'élimination de deux unités de glucose terminales dans le RE représente une étape critique vue son influence sur le repliement et la qualité de la glycoprotéine. En effet, les glycans servent de signaux reflétant l'état de repliement de la protéine et les variantes mal repliées sont sujettes au repliement jusqu'à obtention d'une conformation correcte sinon la protéine est dégradée dans le RE (Bieberich, 2014). Dans le cas d'une glycoprotéine correctement repliée, celle-ci est transférée dans l'appareil de Golgi subissant de nouvelles modifications (Lannoo & Van Damme, 2015). Alors que les structures de type mannose élevé sont assemblées dans le cis-Golgi, la synthèse de N-glycans complexes se produit principalement dans le Golgi-médial. Du précurseur de glycans original construit dans le RE, il ne reste alors que cinq monosaccharides formant la structure de base commune de tous les N-glycans. L'addition d'autres monosaccharides (tels que le galactose ou l'acide sialique terminal), se produit principalement dans le trans-Golgi pour former la structure glycane finale (Rosenlöcher, 2015; Schwarz & Aebi, 2011).

Pour les protéines recombinantes issues de la culture cellulaire, le profil de glycosylation dépend de plusieurs éléments. La lignée cellulaire employée pour la production d'une glycoprotéine joue un rôle prédominant. En effet, des variations ont été constatées au niveau des profils glycaniques d'une IgG chimérique et d'une IgG humanisée produites dans des cellules CHO, NSO ou Sp2/0 (Raju, Briggs, Borge, & Jones, 2000). Le mode de culture peut également influencer le patron de glycosylation. Une comparaison des profils de glycosylation de la SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) exprimée par les cellules CHO suivant différents modes de culture montre que la sialylation est plus importante en perfusion comparé au mode cuvée-alimentée, suggérant que la réduction du taux de croissance observée en perfusion facilite une glycosylation plus complète de la protéine (Kunkel, Jan, Butler, & Jamieson, 2000). D'autres études se sont penchées sur l'effet des paramètres de culture sur la distribution des glycans (voir Tableau 2.1). Un état d'hypoxie, par exemple, montre une certaine variation au niveau de la sialylation de l'hormone FSH (*follicle-stimulating hormone*) tandis que ce profil reste relativement inchangé pour la protéine tPA (*tissue-plasminogen activator*), toutes deux exprimées par des cellules CHO (Hossler et al., 2009). D'autre part, la diminution de la concentration en oxygène dans une culture d'hybridomes a conduit à une réduction du degré de galactosylation de la protéine IgG 1. Butler et al. (M Butler, 2006) suggèrent

que la réduction du niveau d'oxygène affecte le transport vers l'appareil de Golgi où la structure glycanique finale est conçue. L'activité des enzymes (par exemple la glycosyl-transférase) ainsi que le niveau des nucléotides-sucre intervenant dans la glycosylation d'une protéine peuvent être fortement affectés par les changements des conditions de culture, comme la concentration en ammoniacale ou l'osmolarité du milieu (Rosenlöcher et al., 2016). L'accumulation des ions ammonium est généralement toxique pour la cellule. De plus, cela conduit à une altération du pH intracellulaire dont celui de l'appareil de Golgi, ce qui affecte le degré de sialylation de la protéine (Yang & Butler, 2000). Le pH du milieu de culture est également un paramètre important à contrôler pour assurer un profil de glycosylation désiré. Il a été rapporté que les fractions galactosylées et sialylées diffèrent selon que le pH varie entre 6.9 et 7.4 chez les cellules hybridomes (Yoon, Choi, Song, & Lee, 2005; Zanghi, Schmelzer, Mendoza, Knop, & Miller, 1999).

Réduire la température permet dans la majorité des cas de prolonger la viabilité cellulaire, d'augmenter la productivité spécifique et de préserver la qualité des protéines (Bollati-Fogolín et al., 2005; Yoon, Kim, & Lee, 2003). En effet, maintenir une bonne viabilité cellulaire conduit à réduire l'accumulation des glycosidases pouvant dégrader les monosaccharides des glycans. Par ailleurs, Trummer et al. (Trummer et al., 2006) ont montré que la sialylation de l'érythropoïétine est altérée lorsque l'on réduit la température à 33 °C et à 30 °C. Des études ont rapporté que réduire le taux d'expression d'une protéine pouvait laisser place à une meilleure glycosylation chez les cellules murines (Hossler et al., 2009). L'observation reste sujette à controverse car cela peut particulièrement dépendre de la lignée cellulaire et de la protéine produite. Comme chez les cellules CHO où la synthèse de tPA n'affecte pas le processus glycosylation (Bulleid, Bassel-Duby, Freedman, Sambrook, & Gething, 1992).

Tableau 2.1 : Impact des principaux paramètres de cultures et de la composition du milieu sur la glycosylation (*Hossler et al., 2009*)

Paramètres	Impact sur la glycosylation
Faible niveau de glucose/glutamine	Bonne glycosylation des mAb produits par les cellules hybridomes et des IFN- γ produits par des cellules CHO.
Concentration en ammoniacque	Altération de la glycosylation à haute concentration (>2 mM).
Température	Une réduction de température de 37 °C à 30 °C maintient à la fois une bonne productivité et une meilleure glycosylation. Un état hypothermique réduit l'activité des sialidases.
pH	Variation de la galactosylation, de la sialylation et de la micro hétérogénéité selon le pH (6.8-7.8).
pH & température	Meilleure sialylation avec réduction simultanée de la température et du pH.
Oxygène dissout	Effet variable sur la glycosylation. Dépend de la lignée cellulaire et de la protéine produite.
Mode de culture	Plus grande sialylation en mode perfusion qu'en mode cuvée-alimentée.

Un autre point qui peut avoir un certain impact sur la glycosylation des protéines est la composition du milieu de culture. De nombreuses études ont montré que la qualité est sensible à la disponibilité en glucose, glutamine ou galactose durant le procédé de culture. En effet, il a été rapporté que des concentrations très faibles en glucose (<0.7 mM) et en glutamine (<0.1 mM) peuvent conduire à une réduction de la sialylation et à une augmentation de la fraction hautement mannosylée de l'interferon IFN- γ exprimé chez les CHO (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong, Tang Goh, Kiat

Heng, & Gek Sim Yap, 2005). Par ailleurs, cette limitation en nutriments n'affecte pas les profils de glycosylation de l'IgG-IL2 humain produit par les cellules BHK (Cruz, Freitas, Alves, Moreira, & Carrondo, 2000). D'autre part, une alimentation en galactose favoriserait l'obtention d'une structure glycanique complètement galactosylée (M. R. Andersen, Hyun Nam, & Sharfstein, 2011). L'ajout d'autres molécules au milieu de culture comme le butyrate de sodium, agent généralement employé dans le but d'augmenter la productivité spécifique, a démontré avoir des effets néfastes sur la sialylation de la protéine d'intérêt (Sung, Song, Lim, Chung, & Lee, 2004). La supplémentation d'acides aminés complètement consommés en cours de la culture ne semble pas améliorer la sialylation de l'EPO exprimée par les cellules CHO (Crowell, Grampp, Rogers, Miller, & Scheinman, 2007). D'autre part, un certain nombre d'études ont rapporté l'avantage de rajouter certains précurseurs de la glycosylation (manganèse, glucosamine, uridine, N-acétyl glucosamine) afin d'améliorer la qualité des protéines (Blondeel et al., 2015; Martin Gawlitzek, Thomas Ryll, Jim Lofgren, & Mary B Sliwowski, 2000; Michael J Gramer et al., 2011; Villiger et al., 2016).

2.5 Paramètres influençant la performance des cultures cellulaires

Le concept de culture cellulaire remonte aux années 1950 grâce à Moscona qui a procédé à la trypsinisation de tissus d'œufs de poulet pour isoler des cellules capables de se diviser *in vitro*. Depuis, les procédés de culture de cellules animales n'ont cessé de progresser et sont devenus essentiels pour l'obtention de produits à applications thérapeutiques (anticorps monoclonaux, vaccins, protéines recombinantes, etc.). Cette évolution implique l'amélioration des protocoles de culture et donc des capacités de production.

2.5.1 Conditions physico-chimiques

L'environnement dans lequel se trouvent les cellules est critique pour la croissance et le taux de production en protéines. En effet, les conditions de culture doivent être plus au moins similaires à celles de l'organisme d'origine. Comme pour la majorité des êtres vivants, une température de 37 °C est favorable à la croissance. Cependant, la réduction de la température est souvent considérée meilleure pour la production. Il en résulte ainsi une diminution de la consommation en nutriments et un maintien de la viabilité (Seo, Kim, Cho, Baek, & Lee, 2013). Nous détaillerons le point sur l'effet de la réduction de la température plus loin dans cette revue.

Comme pour la température, les chercheurs ont aussi étudié l'effet du pH (souvent autour du pH physiologique) sur le métabolisme cellulaire. Les résultats montrent que l'abaissement du pH induit une longévité de la culture et une augmentation de la productivité. En effet, la productivité spécifique s'est révélée significativement meilleure pour un pH de 6,8 et une température de 37 °C lors d'une culture de cellules CHO (S. H. Kim & G. M. Lee, 2007; Seo et al., 2013). De plus, la consommation des nutriments diminuait conjointement avec la production de métabolites secondaires lorsque le pH était réduit.

Un autre paramètre environnemental a été testé en vue d'augmenter la productivité spécifique des cellules : l'osmolarité du milieu. En effet, un stress hyper-osmotique réalisé par l'ajout de sucres ou de sels ionisés peut stimuler la productivité spécifique en stoppant l'évolution du cycle cellulaire à la phase G1 (Doxsey, Zimmerman, & Mikule, 2005). L'additif le plus utilisé pour ajuster l'osmolarité du milieu est le chlorure de sodium. Il existe, néanmoins, un maximum à ne pas dépasser (environ 400 mOsmo/L) au risque de voir la viabilité cellulaire chuter rapidement. D'autre part, pour réduire l'effet négatif d'une augmentation brusque de l'osmolarité, la glycine bêtaïne a été identifiée comme l'agent le plus efficace, particulièrement avec les lignées CHO (Jain & Kumar, 2008).

Les transferts gazeux sont tout aussi importants. Les concentrations d'oxygène (DO) et de dioxyde de carbone ($p\text{CO}_2$) dissous doivent être contrôlées tout au long de la culture cellulaire. La consommation en oxygène est d'autant plus importante en phase exponentielle et décroît juste après que la culture ait atteint la densité cellulaire maximale (Van der Valk et al., 2010).

2.5.2 Milieu de culture

En plus des conditions environnementales, les milieux de culture doivent répondre aussi fidèlement que possible aux besoins nutritionnels des cellules (J. Zhu, 2012). Pendant des années, la prolifération et l'expression des différentes fonctions cellulaires en culture nécessitaient l'addition d'une certaine concentration de sérum au milieu de base (Van der Valk et al., 2010). Cependant, leur composition indéfinie ne facilitait pas les procédés de purification et ne permettait pas de connaître avec précision les besoins cellulaires. C'est la raison pour laquelle la culture de cellules animales s'est orientée vers l'utilisation de milieux de culture chimiquement définis et sans sérum. Les efforts visent à identifier tous les composants qui sont physiologiquement pertinents pour maintenir la prolifération des cellules en culture, pour stimuler la production en

protéines recombinantes et diminuer la production de déchets métaboliques (Huifeng Zhang et al., 2013). Plusieurs méthodes sont employées afin de développer et de définir au mieux la composition des milieux de culture dans le but de satisfaire la majorité des besoins cellulaires, certaines étant plus au moins complexes que d'autres. L'analyse des flux métaboliques constitue un bon moyen pour comprendre les besoins cellulaires (Ahn & Antoniewicz, 2011; Bonarius et al., 1996; Sengupta, Rose, & Morgan, 2011). Une autre approche repose sur l'optimisation par plans d'expériences après avoir choisi les composants qui sont susceptibles d'avoir un impact sur les cellules (Huifeng Zhang et al., 2013). En dépit de tous les nutriments constituant le milieu de culture, le glucose et la glutamine représentent les sources principales de carbone et d'énergie pour les cellules animales. En effet, le métabolisme énergétique comprend deux voies importantes : la glycolyse et la voie oxydative (voir Figure 2.4). Une fois consommé, le glucose peut être métabolisé selon diverses réactions. La voie de glycolyse en est la principale. En revanche, une grande quantité de glucose dans le milieu engendre, via la glycolyse, du lactate qui est un sous-produit toxique. Son accumulation conduit à la diminution du pH au cours de la culture, ce qui est susceptible de nuire à la viabilité et la productivité cellulaire. Les cellules sont ainsi incapables d'oxyder la totalité du glucose en CO_2 et en eau. Des analyses de flux métaboliques sur les cellules CHO (Claudia Altamirano, Illanes, Becerra, Cairó, & Gòdia, 2006) et HEK293 (Olivier Henry & Durocher, 2011) ont montré que l'utilisation du cycle TCA reste faible par rapport à la glycolyse. En effet, plus de 70% du pyruvate est transformé en lactate. C'est là qu'intervient la glutamine afin de combler ce manque d'énergie. Celle-ci peut parfois représenter la principale source d'ATP (Schneider, Marison, & von Stockar, 1996). Toutefois, la glutaminolyse peut conduire à la production d'une grande quantité d'ammoniaque et peut en principe contribuer indirectement à la formation de lactate. Toujours selon des analyses des flux métaboliques, environ 9% de la glutamine est convertie en lactate chez les cellules d'hybridomes murines (Petch & Butler, 1994). L'ammoniaque est connue pour avoir un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire. De plus, ce métabolite affecte également la qualité des protéines recombinantes en altérant leur patron de glycosylation.

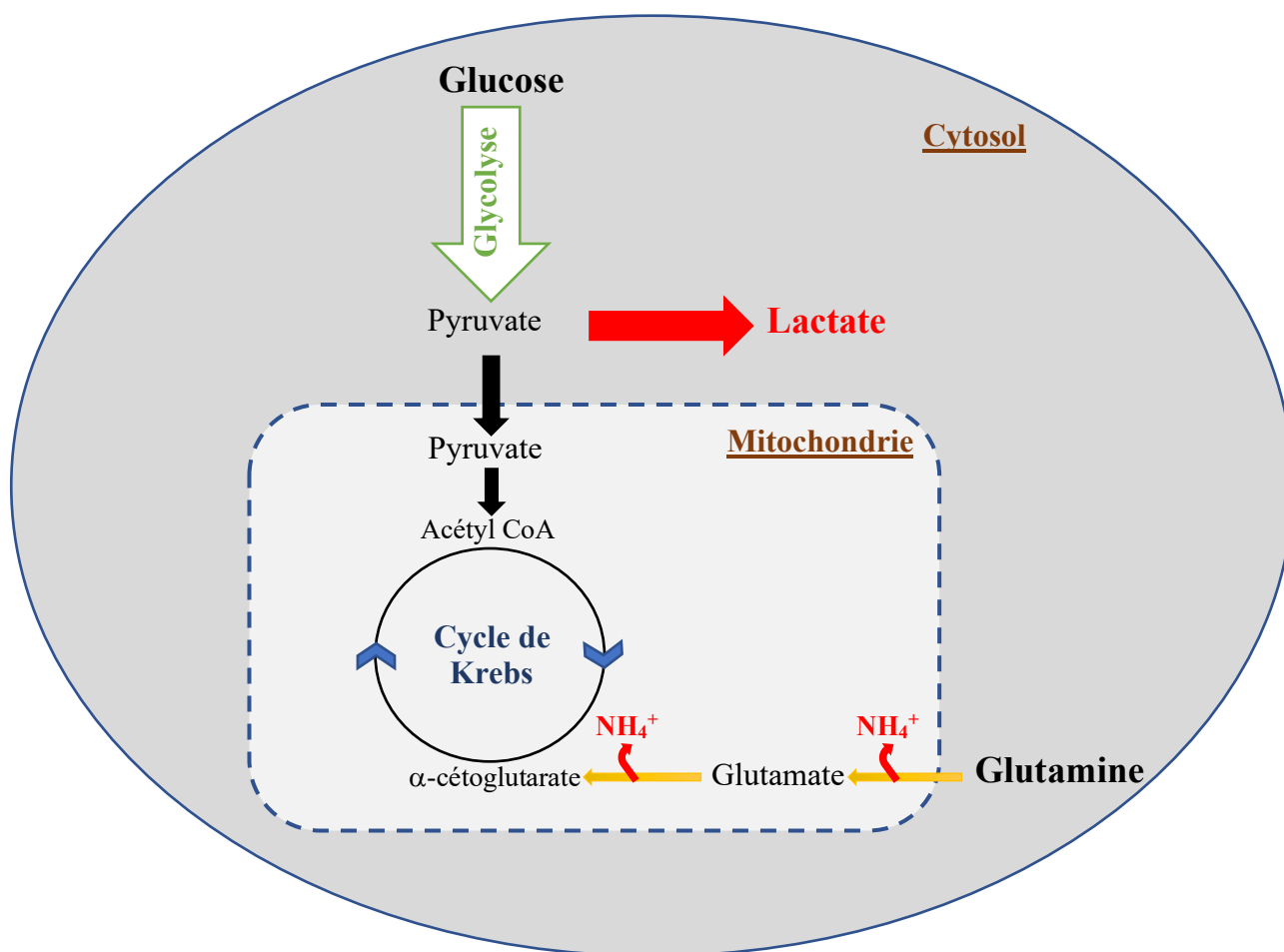


Figure 2.4 : Métabolisme simplifié d'une cellule de mammifère

2.5.3 Déchets métaboliques

Il est reconnu que la croissance et la productivité cellulaire sont inhibées par l'accumulation d'une quantité importante de lactate et d'ammoniaque dans le milieu de culture. Les concentrations inhibitrices peuvent cependant varier selon la lignée cellulaire, le mode de culture et les concentrations initiales en substrats essentiels (Ozturk, Riley, & Palsson, 1992; Patel, Papoutsakis, Winter, & Miller, 2000).

Chez les cellules CHO, et selon l'étude menée par Lao et al., le lactate ne devient inhibiteur de la croissance cellulaire qu'à partir d'une concentration environnant les 60 mM (Cruz et al., 2000; Lao & Toth, 1997). Pour l'équipe de Zhang (Yuanxing Zhang, 2009), la molécule de lactate en tant que telle présente peu d'effet sur la densité cellulaire finale des cellules CHO. Par ailleurs,

l'ajout de sodium lactate conduit à l'augmentation de l'osmolarité dans le milieu et cela se traduit par une réduction du taux spécifique de croissance d'environ 30%. Pour certaines lignées, les cellules présentent un métabolisme permettant de consommer le lactate et ce, même en présence de glucose et d'acides aminés en concentrations non limitantes dans le milieu. Cette consommation permet l'élimination de ce métabolite pouvant être néfaste et donc le maintien d'une bonne viabilité cellulaire (Gambhir, Europa, & Hu, 1999). Mais ce phénomène reste jusqu'à maintenant mal contrôlé. Bon nombre d'études évoquent le ratio de lactate produit sur le glucose consommé. L'équipe de Cruz et al. (Cruz et al., 2000) a montré sur des cultures cuvées-alimentées de BHK que l'utilisation efficace du glucose est dictée par sa concentration résiduelle dans la culture. En effet, lorsque celle-ci est en dessous de 1 mM, le ratio lactate/glucose est réduit à environ 0,5 mol/mol. Cependant, si cette concentration est supérieure à 2 mM, ce ratio s'élève alors à plus de 1.2 mol/mol. La même observation est faite par l'équipe de Gambhir sur les myélomes de souris (Gambhir, Europa, et al., 1999) et par Wong sur des cellules CHO (Chee Fung Wong et al., 2005). Avec leur stratégie de maintien de très bas niveaux en glucose et glutamine dans une culture d'hybridomes, Zhou et ses collaborateurs (Zhou, Rehm, Europa, & Hu, 1997) ont réussi à réduire ce ratio de 0,97 à 0,05 mol/mol. Ceci indique la variabilité de ce ratio au cours de la culture ainsi que le changement du métabolisme de lactate en fonction de la stratégie employée. Par ailleurs, ce changement n'est pas forcément dû à une limitation en glucose dans la culture. En effet, selon Siegwart (Siegwart et al., 1999), le lactate produit est consommé sous des conditions de faible consommation en glutamine dans la culture. L'équipe de Zagari (Zagari, Jordan, Stettler, Broly, & Wurm, 2013) a évoqué de son côté, le rôle important de la glutamine dans la modulation de la concentration initiale en lactate produit et son changement vers une consommation nette en plus de l'influence des transporteurs mitochondriaux sur le métabolisme du lactate. D'autre part, Calleja et al. (Liste-Calleja et al., 2015) suggèrent que le passage du métabolisme d'une consommation de glucose/production de lactate vers une co-consommation du glucose et du lactate est en relation étroite avec le pH du milieu.

Le niveau de toxicité de l'ammoniaque quant à lui, est largement inférieur à celui du lactate. Les effets néfastes sur la croissance se perçoivent à des concentrations variant entre 1 et 5 mM. L'analyse des flux métaboliques sur des cellules CHO montre qu'une concentration avoisinant les 5 mM en ammoniaque altère les fonctions de certaines enzymes impliquées dans la voie de glycolyse. Ce phénomène se manifeste par une baisse de la consommation en glucose et donc une inhibition de la croissance cellulaire (Yuanxing Zhang, 2009).

En mode cuvée-alimentée, le problème d'accumulation de déchets métaboliques est plus prononcé du fait de la supplémentation de nutriments en cours de culture. Afin d'améliorer les performances de ce type de culture, plusieurs approches ont été élaborées dans le but de réduire la production de ces métabolites toxiques ou de les éliminer complètement du milieu de culture. Certaines stratégies utilisent une approche « procédé » et les modifications apportées concernent ainsi les conditions et paramètres environnementaux comme la substitution des nutriments ou leur maintien à de faibles niveaux (discuté dans la prochaine section). On parle également d'utilisation de systèmes de séparation membranaires afin de retirer de manière sélective ces déchets du milieu de culture. D'autres approches se basent sur l'ingénierie cellulaire, comme par exemple l'introduction de la glutamine synthétase (GS) dans des cellules de mammifères qui a conduit à la réduction de la concentration en ammoniac et en lactate simultanément (Bell et al., 1995; Paredes et al., 1999). L'enzyme pyruvate carboxylase (PYC) permet quant à elle la transformation du pyruvate en oxaloacétate pour une meilleure accessibilité au cycle de Krebs. L'effet du gène PYC a été étudié dans plusieurs lignées. Chez les HEK293 (Elias et al., 2003) et les BHK (Irani, Beccaria, & Wagner, 2002), une utilisation efficace des nutriments a été observée conduisant ainsi à une diminution de la production de métabolites toxiques et à un maintien de viabilité cellulaire. Ces résultats ont été appuyés par une analyse des flux métaboliques dans le cas des HEK293 montrant ainsi que plus de 80% du glucose consommé est dirigé vers le cycle de Krebs contre seulement 51% dans les lignées parentales. De plus, la concentration cellulaire a été multipliée par un facteur 2 et la production s'est vu augmenter de 33% (Olivier Henry & Durocher, 2011). Des tendances similaires ont été constatées pour les cellules CHO (Toussaint, Henry, & Durocher, 2016). En dépit d'une consommation en nutriments semblable à la culture contrôle, la concentration en métabolites toxiques a été réduite dans les cultures de cellules modifiées par la PYC, la concentration finale en produit multipliée par deux et la viabilité prolongée. De plus, combiner l'expression de la PYC avec l'abaissement de la température augmentait la production d'un facteur 3 par rapport à la culture contrôle (Bollati-Fogolín et al., 2005). Ces résultats montrent que l'expression de cette enzyme peut être avantageuse pour améliorer les rendements de production en cultures cuvées-alimentées (Vallée, Durocher, & Henry, 2014). En analysant les voies du métabolisme cellulaire, une autre enzyme a fait l'objet de travaux : la lactate déshydrogénase (LDH). Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en lactate. Diminuer l'expression de cette enzyme chez les cellules hybridomes a réduit la production de lactate de 50%. De plus, la densité cellulaire a considérablement augmenté et la productivité spécifique s'en est trouvée doublée (K. Chen, Liu,

Xie, Sharp, & Wang, 2001). Le même résultat a été constaté chez les CHO, en plus d'une meilleure régulation du pH intracellulaire (Jeong et al., 2001). En revanche, la consommation de la glutamine et la production de l'ammoniaque sont restées inchangées. D'autres études se sont penchées sur la réduction du taux de consommation en glucose en réprimant l'expression du transporteur GLUT1 ou bien en transfectant les cellules avec le transporteur GLUT5, permettant ainsi une culture dans un milieu avec fructose et une réduction de la production de lactate (Richelle & Lewis, 2017).

2.5.4 Modes de culture

La production de protéines recombinantes peut se faire selon différents modes de culture dont les principaux sont illustrés dans la Figure 2.5.

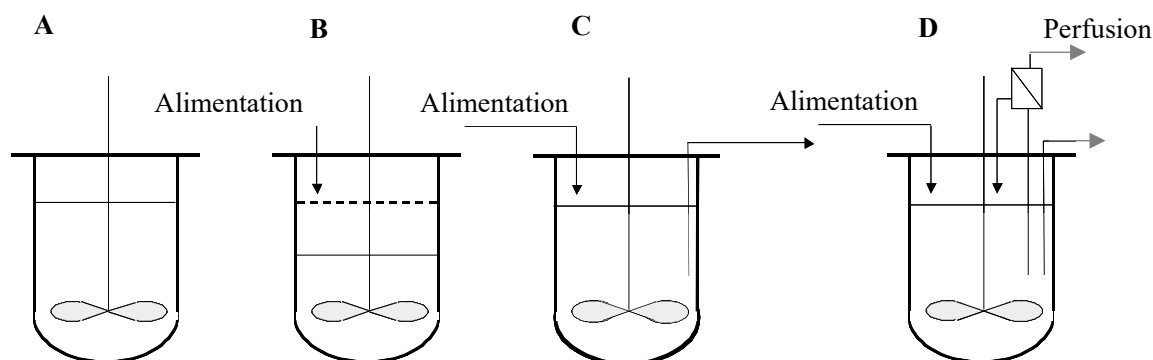


Figure 2.5: Représentation schématique des différents modes de culture : (A) cuvée, (B) cuvée-alimentée, (C) chémostat et (D) perfusion (M. C. F. Dalm, 2007).

La culture en mode cuvée est couramment utilisée du fait de sa simplicité d'opération et de son faible coût. Durant ce type de cultures, aucun ajout ou retrait de cellules ou de milieu n'est effectué. On considère alors que la culture se produit à volume essentiellement constant et qu'à la fin du procédé tout le contenu du bioréacteur est récolté (Eibl, Eibl, Pörtner, Catapano, & Czermak, 2008). L'appauvrissement du milieu en nutriments ainsi que l'accumulation de métabolites au cours de la culture conduisent à une mort cellulaire précoce. Typiquement, la durée du procédé varie entre 5 à 10 jours, atteignant des densités cellulaires d'environ $2 \text{ à } 5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ (Eibl et al., 2008; Christel Fenge & Lu, 2005) et les rendements en produit final restent habituellement relativement faibles.

Dans les cultures cuvée-alimentée, des nutriments sont ajoutés en continu ou de façon discontinue afin de prolonger la croissance cellulaire, de maintenir la viabilité, d'augmenter le titre en produit et de réduire la formation de métabolites indésirables. La durée d'un tel procédé peut dépasser plus de 15 jours avec des concentrations cellulaires maximales de l'ordre de 10^7 cells/mL (M. C. F. Dalm, 2007) et des rendements finaux de 5 à 10 fois les quantités en protéines obtenu en mode cuvée (Christel Fenge & Lu, 2005). Dans ce type de culture, le protocole d'alimentation (composition de la solution alimentée ainsi que les paramètres liés aux ajouts, comme la fréquence des ajouts et les volumes) doit procurer un apport en nutriments essentiels tout en évitant l'accumulation de déchets métaboliques. La simplicité et la robustesse font de ce procédé l'un des plus employés à l'échelle industrielle pour la production de protéines recombinantes (T. A. B. a. D. K. Robinson, 1995; Sun et al., 2013; Templeton, Dean, Reddy, & Young, 2013)

Les cultures opérées en mode continu (chémostat) sont caractérisées par une alimentation et un soutirage effectués au même débit. Le volume de la culture reste donc constant et un état stationnaire s'établit sur toute la durée du procédé. Surtout utilisé comme outil de recherche pour établir des conditions bien définies et constantes, ce mode de culture est cependant associé à de faibles rendements en biomasse et les risques de contamination sont plus importants, si bien qu'il n'est pas tellement intéressant dans un contexte de production industrielle (Christel Fenge & Lu, 2005). La perfusion est une variante du mode chémostat et est considérée beaucoup plus complexe du fait qu'elle requiert un système de rétention des cellules et il s'agit d'un procédé qui peut s'étaler sur plusieurs mois de culture. La rétention cellulaire peut être réalisée par plusieurs dispositifs (e.g. filtration ou centrifugation) placés soit à l'intérieur soit à l'extérieur du bioréacteur (Castilho & Medronho, 2002; Voisard, Meuwly, Ruffieux, Baer, & Kadouri, 2003). Pour des productions industrielles allant jusqu'à 500 L, les filtres centrifugeuses/rotatifs sont les plus utilisés (Voisard et al., 2003). Comparée aux autres modes de culture, la perfusion permet d'atteindre des concentrations cellulaires très élevées (entre 10^7 et 10^8 cells/mL) et ainsi garantir des productivités jusqu'à 10 fois plus importantes (Heine, Biselli, & Wandrey, 1999).

2.6 Approches établies pour l'amélioration des rendements de culture

Cette section aborde les principales approches établies ces dernières années en mode cuvée-alimentée pour l'amélioration des rendements de production. Le cas particulier des cultures bi-phasiques et le recours à la perfusion comme alternative industrielle sont également présentés.

2.6.1 Le mode de culture cuvée-alimentée

Plusieurs stratégies en mode cuvée-alimentée ont été développées dans le but de réduire l'accumulation de lactate et d'ammoniaque ainsi que de remédier aux limitations en nutriments essentiels. Cela a eu pour effet l'augmentation des concentrations en biomasse et en produit. Le défi pour ce mode opératoire réside dans le développement de stratégies d'alimentation efficaces. Dans une culture en mode cuvée-alimentée, la quantité d'un nutriment à ajouter dépend de son taux de consommation, qui est à son tour fonction de la densité cellulaire et du métabolisme. Par ailleurs, le métabolisme du glucose, de la glutamine et des autres acides aminés sont interdépendants. Il est donc important de déterminer les cinétiques de consommation individuelles des nutriments, mais également d'établir les différentes connexions entre elles.

2.6.1.1 Stratégies d'alimentation

2.6.1.1.1 *Stratégies basées sur la réduction des métabolites secondaires*

La méthode de substitution des nutriments principaux par d'autres sources de carbone a démontré son efficacité dans la réduction des métabolites toxiques en dépit du fait qu'elle entraîne presque toujours une diminution du taux de croissance (Claudia Altamirano, Berrios, Vergara, & Becerra, 2013). Remplacer le glucose par d'autres sucres (le mannose, fructose ou galactose, par exemple) réduit la formation de lactate et peut même l'éliminer complètement (Claudia Altamirano et al., 2006; C Altamirano, Paredes, Cairo, & Godia, 2000; Claudia Altamirano, Paredes, Illanes, Cairo, & Godia, 2004). Par ailleurs, l'ajout de fructose nécessite la présence de transporteurs spécifiques à ce sucre, entre autres le GLUT5. Puisque l'affinité du fructose pour ce transporteur est faible, sa consommation se fait plus lentement ce qui réduit sensiblement la production de lactate. Cet effet a permis de prolonger la phase de croissance en mode cuvée-alimentée et de presque tripler la concentration cellulaire maximale (Wlaschin & Hu, 2006). Dans leur étude, Sun et son équipe (Sun et al., 2013) ont réussi à optimiser le ratio glucose/galactose de

leur solution d'alimentation permettant ainsi une augmentation de 45% et 143% de l'intégrale des cellules viables et de la production spécifique en anticorps, respectivement. De plus, l'accumulation du lactate au cours de la culture a été réduite de 55%.

Pour continuer dans ce même ordre d'idée, et dans le but de réduire la quantité d'ammoniaque et d'augmenter le rendement en produit, la glutamine peut être remplacée par d'autres composés comme l'alanine, le glutamate, l'asparagine, le pyruvate ou l'alpha-cétoglutarate. Le glutamate semble être le candidat de substitution idéal avec une augmentation de la production des CHO d'un facteur de 1,7 et une bonne glycosylation de la protéine d'intérêt (Hong, Cho, & Yoon, 2010). En revanche, et comme cité précédemment, les cellules doivent être équipées de la machinerie nécessaire (entre autres la glutamine synthétase dans ce cas) afin de répondre aux besoins en glutamine via le glutamate et l'ammoniaque (Fischer, Handrick, & Otte, 2015; F. Zhang, Sun, Yi, & Zhang, 2006). L'analyse de flux métaboliques de cellules CHO possédant le gène glutamine synthétase et cultivées dans un milieu sans glutamine montre la nécessité de la présence de substituts à la glutamine. En effet, l'absence d'asparagine considérée comme source intracellulaire d'azote conduit à l'arrêt de la croissance cellulaire (Duarte et al., 2014). La substitution de la glutamine dans le milieu d'alimentation par un dipeptide de glutamate-pyruvate a permis de réduire la production en ammoniaque de 45% d'un procédé cuvée-alimentée de cellules CHO. De plus, l'ajout d'hydrolysate de gluten de blé à cette solution d'alimentation a doublé la production en tPA sans compromettre le patron de glycosylation de cette protéine (D. Y. Kim et al., 2013). D'autre part, l'utilisation de dipeptides comme l'alanyl-glutamine ou bien le glycyl-glutamine semble être avantageuse du fait que ces derniers soient très peu ammoniagéniques. Par ailleurs, un des inconvénients majeurs de cette substitution est la formation de quantités importantes d'alanine et de glycine (plus que ce qu'il en faut pour la cellule), ce qui modifie l'osmolarité du milieu au détriment de la culture (Xie & Wang, 1997). L'équipe d'Altamirano (C Altamirano et al., 2000) a réussi à substituer simultanément le glucose et la glutamine du milieu de culture de cellules CHO en les remplaçant par le galactose et le glutamate, respectivement. En dépit d'une consommation optimale des nutriments et de la réduction de la production de déchets métaboliques, la croissance cellulaire s'est vue réduite comparativement à des combinaisons nutritionnelles impliquant le glucose dans la formulation du milieu.

La substitution peut être une approche intéressante dans le sens où elle réduit le taux d'accumulation des sous-produits toxiques du métabolisme. En revanche, il faut un temps

d'adaptation aux cellules afin d'assimiler efficacement ces nouveaux nutriments. De plus, ce ne sont pas toutes les lignées qui peuvent utiliser ces sources alternatives, ce qui rend cette technique peu généralisable. Il existe, par ailleurs, d'autres méthodes contribuant à l'optimisation du milieu et à la régulation efficace du métabolisme du glucose et de la glutamine sans pour autant les remplacer. C'est ce que nous allons développer dans les paragraphes qui suivent.

En effet, le maintien de concentrations faibles en nutriments est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour minimiser la production de déchets métaboliques et maximiser celle des protéines à long terme (Bhanu Chandra Mulukutla, Kale, Kalomeris, Jacobs, & Hiller, 2017). Le métabolisme cellulaire est donc rendu plus efficace en poussant les cellules à oxyder une grande partie du glucose en CO₂, ce qui réduit significativement la production de sous-produits toxiques. Les taux de consommation en glucose et en glutamine sont alors influencés par la stratégie employée. En général, les cultures avec des concentrations faibles en glucose conduisent à la formation de quantités relativement faibles en lactate, cependant, la consommation de glutamine et la formation d'alanine et d'ammoniaque sont souvent élevées (S. Lu, Sun, & Zhang, 2005). D'autre part, pour des conditions faibles en glutamine, les productions d'ammoniaque, d'alanine et de lactate sont réduites (Y. Y. Lee, Yap, Hu, & Wong, 2003). Ces dernières sont d'autant plus réduites dans le cas d'une stratégie combinant le maintien de niveaux bas à la fois en glucose et en glutamine (Ljunggren & Häggström, 1994; Xie & Wang, 1994a). L'une des premières applications fut effectuée sur des cellules animales hybridomes en maintenant tout d'abord le glucose à 0,5 mM puis la glutamine à 0,2 mM. Une meilleure utilisation du cycle de Krebs fut observée avec une réduction importante de la production de lactate et d'ammoniaque. Cela a permis une concentration cellulaire maximale avec une production atteignant 250 mg/L, comparativement à 8 mg/L pour la culture contrôle (Zhou, Rehm, et al., 1997). Une étude plus récente sur cette même lignée a montré que la combinaison d'un bas niveau en glucose et en glutamine dans une culture cuvée-alimentée a permis une réduction des métabolites toxiques ainsi que l'atteinte de 7 fois la concentration en anticorps monoclonaux établie en culture cuvée (environ 350 mg/L) (L. Zhang, Shen, & Zhang, 2004). Cependant, dans le cas des cellules CHO, le maintien de ces deux nutriments à de faibles niveaux affectait la qualité de glycosylation des protéines (Chee Fung Wong et al., 2005). Lu et al. (S. Lu et al., 2005) ont constaté dans leur étude que la glutamine est utilisée par les cellules CHO pour combler le manque de glucose. En effet, la croissance cellulaire est limitée en dessous d'une concentration de 1,22 mM en glucose et la réduction de l'ATP intracellulaire due à la limitation en glucose montre que l'énergie peut être la raison d'une faible croissance cellulaire.

Dans ces conditions, le recours du métabolisme cellulaire à la glutaminolyse lors de cultures BHK avec de très faibles niveaux en glucose a aussi été rapporté (Cruz, Ferreira, Freitas, Moreira, & Carrondo, 1999). D'un autre côté, Liu et son équipe (B. Liu et al., 2014) ont montré dans leur étude sur les cellules CHO que la concentration initiale en glucose dans le milieu de culture affecte non seulement la croissance cellulaire et la productivité, mais également le patron de glycosylation de la protéine d'intérêt. En effet, avec des concentrations variant entre 0 et 12 mM en glucose, le pourcentage d'anticorps non-glycosylés passe de 50% à 26%, respectivement. Au-delà de 15 mM en glucose, tous les anticorps sont glycosylés. De plus amples résultats issus du maintien de faibles concentrations en glucose et/ou glutamine dans la culture sont rapportés dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Stratégies basées sur le maintien de bas niveaux en nutriments. Le ‘/’ signifie la non disponibilité d’information quant à certains paramètres.

Lignée	GLC (mM)	GLN (mM)	LAC (mM)	NH3 (mM)	X (10e6/mL)	P (mg/L)	Qualité	Références
CHO	3	/	-6X	/	5 (2X plus)	30 (4X plus)	Meilleure	(Xie & Wang, 1997)
CHO	/	0,3	Réduit	Réduit	Pas de variation	10X plus	Meilleure	(Chee Fung Wong et al., 2005)
CHO	0,35	0,3	Réduit	Augmenté	/	Réduit	Altérée	
CHO	5	0,5	-10%	- 78%	+ 30%	/	/	
HEK293	1	/	-3X	/	-1,6 X	/	/	(Siegwart et al., 1999)
HEK293	/	0,1	Réduit	Réduit	2X plus	10X plus	/	(Y. Y. Lee et al., 2003)
HYBRIDOME	1,1	0,7	-33%	/	4,1 (2X plus)	172(2X plus)	/	(Kurokawa, Park, Iijima, & Kobayashi, 1994)
HYBRIDOME	0,5	0,2	-4X	-1,5X	> 10	250(7X plus)	/	(Zhou, Rehm, et al., 1997)
HYBRIDOME	faible	faible	-25%	-38%	10,7 (1,8X plus)	>2400 (2,6X plus)	/	(Xie & Wang, 1997)
HYBRIDOME	0,5	0,3	-62,6%	-744%	10 (3X plus)	250 (1.5X plus)		(L. Li et al., 2005)
PER.6C	0,5	0,25	-100%	- 15%	Pas de variation	/	/	(Maranga & Goochee, 2006)
MYÉLOME DE SOURIS	0,55	/	- 2X	/	7,7 (1,5X plus)	660 (9X plus)	/	(Gambhir, Europa, et al., 1999)

2.6.1.1.2 Stratégies basées sur un indicateur du métabolisme

Lors de la culture de cellules animales, le suivi des substances nutritives et des métabolites ainsi qu'une connaissance approfondie du métabolisme jouent un rôle important pour définir les stratégies d'alimentation. La mesure de certains composés fournit des informations sur l'état métabolique et le cycle de vie des cellules. Ces données peuvent servir à déterminer la quantité et la fréquence des ajouts en nutriments. Tout ceci, dans le but d'éviter l'accumulation des substrats et des déchets dans le milieu. Bien que la possibilité de suivre et de contrôler certaines variables *in situ* soit très utile, la majorité des stratégies de culture en bioréacteur restent encore basées sur des mesures hors ligne. En effet, des paramètres essentiels à l'optimisation et au contrôle des procédés telles que la concentration cellulaire et la composition des milieux nécessitent le plus souvent une prise d'échantillon suivie d'une estimation par des méthodes analytiques.

La détermination de la biomasse par les méthodes traditionnelles, l'hémacytomètre par exemple, montre certaines incertitudes en raison de la variabilité dans l'échantillonnage et parfois dans la mesure elle-même. Toutefois, de nouvelles technologies permettent l'estimation de la densité cellulaire en ligne par la mesure de la densité optique ou de la capacitance du milieu de culture (Kiviharju et al., 2007; F. Lu et al., 2013). En revanche, ces techniques donnent des informations limitées sur l'activité métabolique de la culture. Par conséquent, l'utilisation de techniques indirectes, comme celles basées sur la consommation de nutriments ou sur la formation de métabolites, peuvent combler ces limitations. Comme pour la mesure de la biomasse, à l'échelle industrielle, très peu de méthodes existent pour l'estimation des nutriments à l'intérieur du bioréacteur (Becker et al., 2007). Les mesures *ex situ* demeurent à ce jour le meilleur moyen disponible. Cela a conduit à se tourner vers l'utilisation de paramètres facilement mesurables pour une estimation indirecte du métabolisme cellulaire, via par exemple le taux de consommation en oxygène ou la variation du pH.

En effet, une stratégie basée sur la mesure de la consommation en oxygène repose sur la connaissance du rapport stœchiométrique entre la demande des cellules en oxygène et le nutriment essentiel. On alimente alors en conséquence en tenant compte de l'évolution de la culture. On peut

aussi élaborer des méthodes visant à maintenir une concentration constante en nutriment dans le milieu. Des études se sont alors servies de cette approche afin de maintenir une trajectoire définie de la densité cellulaire viable. C'est d'ailleurs ce sur quoi s'est basée l'équipe d'Aehle (Aehle, Schaepe, Kuprijanov, Simutis, & Lübbert, 2011) en émettant comme hypothèse que le profil du taux de croissance spécifique est corrélé à un unique profil du taux de consommation en oxygène (OUR). D'autres études se sont également basées sur la détermination de l'OUR dans le but de définir la quantité et le moment d'alimentation de culture cuvée-alimentée de cellules NS0 (Zhou, Chen, Buckland, & Aunins, 1997) et de cellules d'hybridomes (Eyer, Oeggerli, & Heinzle, 1995; Zhou, Rehm, & Hu, 1995).

Tsao et son équipe (Tsao et al., 2005) ont suggéré dans leur étude sur les CHO l'utilisation du taux de consommation cumulatif du glucose et du lactate pour élaborer des stratégies d'alimentation en mode cuvée-alimentée. Souvent, lorsque le glucose devient limitant, les cellules consomment le lactate qu'elles produisent. Ce métabolite néfaste peut être alors considéré comme source de carbone et d'énergie. En effet, des résultats expérimentaux issus de cultures en cuvées montrent que ce taux cumulatif est corrélé linéairement à la quantité de biomasse (F. Chen et al., 2012b).

L'autre paramètre que l'on peut aisément suivre de manière continue dans le bioréacteur est le pH. Une corrélation peut alors servir pour estimer la consommation de glucose connaissant la concentration en lactate dans le milieu. Ce nutriment peut ainsi être maintenu à une concentration très faible dans la culture afin de réduire la production de lactate. Cependant, la sensibilité de cette méthode dépend de la quantité de lactate dans le milieu et qui se doit d'être non négligeable pour percevoir une variation du pH. Comme cité précédemment, certaines lignées cellulaires ont tendance à consommer le lactate qu'elles produisent, en particulier les CHO. Des chercheurs ont alors exploité cette donnée sachant que l'acidification du milieu est souvent due à l'accroissement de ce métabolite dans la culture. La méthode développée par Gagnon et ses collaborateurs (M. Gagnon et al., 2011) contribue à combler certains besoins cellulaires ainsi qu'à avoir un meilleur contrôle de la culture. Elle est basée sur une simple mesure du pH. Le changement du métabolisme des CHO vers la consommation de l'acide lactique conduit à l'augmentation du pH déclenchant ainsi une faible addition de glucose. Quand le glucose atteint des concentrations critiques, les

cellules commencent à le convertir en pyruvate puis en lactate. Le lactate est transporté vers le milieu extracellulaire et contribue à la diminution du pH conduisant ainsi à l'arrêt de l'alimentation en glucose. Pour 9 lignées cellulaires, le titre final en produit s'est vu pratiquement doublé. Cette augmentation est en partie due à une bonne croissance cellulaire et à une productivité spécifique élevée. Par ailleurs, en réduisant l'activité de la voie de la glycolyse, les cellules se tournent vers la glutaminolyse pour combler le manque d'énergie, ce qui conduit à des concentrations d'ammoniaque élevées. De plus, l'application de cette méthode se limite aux lignées possédant la capacité de consommer le lactate. Enfin, le pH peut dévier de sa valeur physiologique ce qui serait néfaste pour la culture.

De son côté, l'équipe de Lu (F. Lu et al., 2013) a élaboré une stratégie d'alimentation basée sur la prédiction du taux de consommation en nutriment et de la concentration cellulaire ultérieure. Deux lignées cellulaires CHO ont été testées lors de cette étude. Le titre en produit est passé de 5 à 6,3 g/L pour la lignée A et de 4 à plus de 9g/L pour la lignée B. On peut par ailleurs et comme l'ont suggéré les équipes de Tsao et Chen (F. Chen et al., 2012b; Tsao et al., 2005) s'inspirer de méthodes proposées dans d'autres modes de culture afin d'élaborer des stratégies cuvées-alimentées. Ducommun et ses collaborateurs (Ducommun et al., 2001) sont arrivés à estimer de manière indirecte la biomasse en mode cuvée en se basant sur un taux métabolique. En revanche, cela demande la détermination du taux spécifique de consommation qui est variable au cours de la culture.

2.6.1.1.3 Stratégies à partir de modèles cinétiques

Les approches mathématiques ont une importance cruciale pour la quantification et la caractérisation de la physiologie cellulaire. En effet, le modèle mathématique représente un outil très utile pour un design expérimental direct dans le but d'améliorer et d'optimiser les performances d'une culture. Le défi de cette méthode repose sur l'obtention d'un modèle cinétique robuste ayant une bonne capacité prédictive. Pour ce faire, le modèle doit être capable de décrire la croissance et la production des cellules en fonction des substrats disponibles. Un grand nombre de données peut être alors nécessaire à son développement et à sa validation. La cellule peut être considérée comme un système ouvert en raison des échanges continus avec le milieu environnant.

La dynamique du métabolisme cellulaire implique alors un processus coordonné de réactions biochimiques interdépendantes (De la Fuente, Cortes, Pelta, & Veguillas, 2012). Étant donné que les cellules en culture présentent des comportements différents en fonction des fluctuations environnementales, ces approches mathématiques sont utiles pour prédire la réponse dynamique du réseau métabolique face à la variation des conditions (Chin, Chubukov, Jolly, DeRisi, & Li, 2008; Cloutier & Wang, 2011). En effet, plusieurs perturbations peuvent affecter le métabolisme cellulaire ou bien conduire à des changements d'état (Ghorbaniaghdam, Henry, & Jolicoeur, 2013; F. Zhang et al., 2006; L. Zhang et al., 2004). Par conséquent, le mécanisme de régulation cellulaire est important pour assurer l'homéostasie métabolique et le développement de modèle mathématique décrivant le comportement cellulaire face aux différents changements est tout aussi complexe.

De manière générale, les modèles mathématiques des systèmes biologiques sont basés sur deux approches : une modélisation structurée qui considère les différents compartiments cellulaires individuellement et une modélisation non-structurée qui néglige la structure interne et considère un modèle empirique dérivant de l'analyse de métabolites extracellulaires. Bien que la modélisation structurée fournisse une description plus détaillée de la structure interne de la cellule, il est souvent difficile de calibrer/valider un tel modèle puisqu'il nécessite beaucoup de mesures intracellulaires ce qui limite son application pour un contrôle en temps réel (Sidoli, Mantalaris, & Asprey, 2004). D'autre part, les modèles non-structurés sont plus simples à élaborer mais leur capacité prédictive en culture demeure limitée en raison du manque d'informations intracellulaires. Le recours à l'analyse de flux métabolique qui est également une approche de modélisation mathématique peut ainsi fournir les renseignements manquants quant au comportement intracellulaire (Boghigian, Seth, Kiss, & Pfeifer, 2010). Cependant, cette méthode est dans l'impossibilité de décrire la dynamique du processus. Tout récemment, l'équipe de Wahrheit (Wahrheit, Nicolae, & Heinzle, 2014) a réussi à appliquer une analyse de flux dynamique pour suivre dans le temps l'impact de la disponibilité en glutamine sur la physiologie des cellules CHO. Un modèle dynamique comme celui développé par Ghorbaniaghdam et al. (Ghorbaniaghdam et al., 2014) peut être employé comme outil pour effectuer l'optimisation *in silico* des conditions de culture. Robitaille et al. (Robitaille, Chen, & Jolicoeur, 2015) ont ainsi montré la capacité du

modèle à décrire la production d'anticorps en modes cuvée et cuvée-alimentée avec différents milieux de culture.

2.6.1.2 Les procédés bi-phasiques

Au cours des dernières années, un certain intérêt s'est manifesté quant à l'utilisation des procédés bi-phasiques, étant donné que la productivité spécifique des cellules animales est généralement inversement corrélée à la croissance (F. Li, Vijayasankaran, Shen, Kiss, & Amanullah, 2010). De plus, l'utilisation du cycle TCA est plus prononcée lors de la phase de production (Templeton et al., 2013; Young, 2013). De ce fait, des stratégies de culture en deux temps sont proposées : une phase initiale qui vise à promouvoir la croissance rapide de la biomasse puis une phase durant laquelle on cherche à privilégier la synthèse du produit. Plusieurs approches ont été employées comme par exemple l'ajout de réactifs ou le changement de température/pH. De nombreux agents inhibant la synthèse de l'ADN, comme la thymidine ou le butyrate de sodium, ont été utilisés pour stimuler la productivité spécifique. Zhang (Yuanxing Zhang, 2009) rapporte dans sa revue qu'à partir d'une certaine concentration (2 mM), le butyrate de sodium (NaBu) inhibe la croissance des cellules CHO. Par ailleurs, la présence de NaBu à des temps définis a favorisé la production d'EPO. En revanche, la qualité des protéines doit être reconsidérée car leur glycosylation semble être altérée sous l'effet de cet additif. L'équipe de Hendrick (Hendrick et al., 2001) a déterminé le pourcentage de cellules en phase G0+G1 à 54% après 24h de l'ajout du butyrate de sodium comparé à 43% dans la culture contrôle sans additif. D'autre part, combiner le butyrate de sodium avec l'expression du gène Bcl2 ou avec des conditions d'hyperosmolarité a montré une augmentation de la productivité de certaines lignées CHO et un ralentissement de la mort cellulaire (N. S. Kim & Lee, 2000). Quant au DMSO (dimethyl sulfoxide), son addition à des cultures CHO a montré deux effets antagonistes. D'un côté, il augmente leur productivité d'un facteur 1,4 à 1,6. Mais d'autre part, il induit l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 ce qui réduit la croissance cellulaire. Il convient alors d'élaborer une culture à deux niveaux : dans un premier maximiser la biomasse dans un milieu sans DMSO, par la suite, on le rajoute afin d'atteindre de hautes concentrations en produit. Enfin, il a été observé que ce réactif affecte le métabolisme en diminuant la production de lactate grâce à une réduction de la consommation en glucose d'environ

50% (C.-H. Liu, Chu, & Hwang, 2001). L'ajout d'hypoxanthine et de thymidine à de faibles concentrations lors de la phase de croissance et à des concentrations plus élevées lors de la phase de production a permis de maximiser la densité cellulaire viable et d'augmenter le titre en anticorps de 26% par rapport à une culture contrôle (F. Chen et al., 2012a). Plus récemment, un changement de pH (de 7.15 à 6.85) lors d'une culture de cellules CHO en perfusion a permis d'allonger la durée de la culture, d'augmenter la productivité en anticorps anti-CD52 mais également d'améliorer les attributs de qualité de la protéine d'intérêt en augmentant les fractions galactosylées et afucosylées (Zheng et al., 2017). Il a cependant été rapporté que l'effet du pH sur les performances d'une culture dépend de la lignée cellulaire employée. Entre autres, certaines recherches ont rapporté que les productivités spécifiques sont plus élevées avec un pH alcalin (7.6-7.8) (Borys, Linzer, & Papoutsakis, 1993), alors que d'autres groupes ont montré des niveaux relativement constants sur un intervalle de 6.8-7.8 (Trummer et al., 2006; Yoon et al., 2005).

Dans un bioprocédé standard, les cellules de mammifères sont cultivées à 37 °C. Cependant, il est désormais bien connu que des conditions légèrement hypothermiques (27-34 °C) induisent une meilleure expression de la protéine d'intérêt pour plusieurs lignées cellulaires (Wulhfard et al., 2008). On constate dans ce cas un ralentissement du métabolisme cellulaire caractérisé par une diminution de la consommation en nutriments et un maintien de la viabilité (H. Kim & G. M. Lee, 2007). Ainsi, la culture en 2 phases est souvent préconisée afin de permettre dans un premier temps la production d'une grande quantité de biomasse (37°C). Par la suite, une diminution de la température aide à prolonger la viabilité en maintenant les cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire (Takahashi, Tereda, Ueda, Makishima, & Suzuki, 1994). Les deux tableaux qui suivent résument quelques résultats d'études qui se sont penchées sur l'effet de la réduction de la température dans le cas de procédés bi-phasiques.

Tableau 2.3 : L'hypothermie et son impact sur l'évolution de la culture. Les conclusions tirées sont comparées aux cultures contrôles à 37 °C

Lignée/protéine produite	Température (°C)	Impact sur les performances de culture	Références
CHO / mAb	31	Augmentation de la production d'un facteur 3, réduction des taux de consommation en nutriments et de production de déchets métaboliques.	(Wulhfard et al., 2008)
CHO / EPO	33	L'analyse protéomique révèle une surexpression de protéines intervenant dans la glycolyse et la synthèse de la protéine d'intérêt (comme la phospho-glycérate kinase et la DPI).	(Baik et al., 2006)
CHO / -	30	Augmentation du pourcentage de cellules en phase G1 et réduction des taux métaboliques.	(Moore et al., 1997)
CHO / anticorps monoclonal	32	Sur les 12 clones testés, une réduction du taux de croissance spécifique de 30-63% et une productivité spécifique 4-25X plus élevée.	(Yoon, Hwang, & Lee, 2004)
CHO / -	33	Amélioration de 2-3X de la productivité spécifique et identification du promoteur CHO S100a6 comme étant inductible à la température	(Thaisuchat, Baumann, Pontiller, Hesse, & Ernst, 2011)

CHO / -	30	Le profilage révèle une sur-régulation des ARN anti-apoptotique, antiprolifératif et pro-productif sur les 3 clones analysés	(Stiefel, Fischer, Sczyrba, Otte, & Hesse, 2016)
CHO / EPO-Fc	33.5	La production spécifique est augmentée de 20%, diminution de l'agrégation de la protéine de 75% à 1%, les taux de consommation et production en nutriments et métabolites sont respectivement réduits.	(Kaisermayer et al., 2016)
CHO / EPO	32 & 33	La productivité spécifique et la production volumétrique sont augmentées, la croissance cellulaire est arrêtée, la glycosylation de la protéine est non altérée.	(Ahn, Jeon, Jeong, Lee, & Yoon, 2008)
CHO / TNFR-Fc	30	La productivité spécifique est 5X plus importante, le profilage révèle une grande stabilité de l'ARNm de la TNFR et non une augmentation des copies du gène relatif à cette protéine (le temps de demi-vie de l'ARN est de 5.55h à 30°C comparé à 3.69h à 37°C).	(Kou, Fan, Zhou, Ye, Liu, et al., 2011)
CHO / TNFR	30	Une augmentation d'un facteur 5 et 3 pour la productivité spécifique et le titre, respectivement ; réduction du ratio molaire Y(L/G) de 50%, pas d'altération de la sialylation.	(Kou, Fan, Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011)

Tableau 2.4 : Effet de la combinaison entre la réduction de la température et d'un autre paramètre de culture. Les cultures contrôles sont conduites à 37 °C sans aucune autre modification.

Combinaison : réduction de la température avec un autre paramètre	Impact sur les performances de la culture	Références
32 °C & osmolarité à 470 mOsm/kg	Amélioration de la production d'un facteur 5.3 et diminution de l'agrégation de la protéine d'intérêt.	(Y. K. Han, Koo, & Lee, 2009)
30 °C & pH à 6.9 32 °C & pH à 7	Augmentation de la production volumétriques et maintien d'une bonne glycosylation (la perte de sialylation qui peut apparaître avec la baisse de température est évitée grâce à la réduction du pH).	(Trummer et al., 2006; Yoon, Kim, Song, & Lee, 2006)
31 °C & addition d'acide valérique	Maintien d'une bonne viabilité cellulaire (%G0+G1 est augmenté 1.6X), réduction du ratio molaire Y(L/G) d'un facteur 1.8, productivité spécifique 4X plus élevée.	(Coronel et al., 2016)
32 °C & facteur de croissance. Fibroblaste basique (bFGF)	Le taux de croissance spécifique est inchangé alors que la productivité spécifique est réduite (q_p corrélée directement avec le pourcentage de cellules en phase S et donc la production est associée à la croissance pour cette lignée)	(Fox, Yap, & Wang, 2005)
33 °C & Sodium butyrate	Augmentation de la productivité spécifique d'au moins 80%, surexpression de deux gènes anti-apoptotiques, enrichissement des voies de sécrétion de la protéine d'intérêt, particulièrement dans l'appareil de Golgi.	(Avello et al., 2017; Kantardjieff et al., 2010)

2.6.2 La perfusion comme alternative

Bien qu'une culture en perfusion soit relativement plus complexe à opérer qu'une cuvée-alimentée, un intérêt grandissant est consacré à ce mode de culture au cours des dernières années. Le procédé consiste en un renouvellement continu du milieu de culture basal tout en conservant les cellules dans le bioréacteur, ce qui procure un environnement cellulaire stable et un temps de rétention faible de la protéine d'intérêt. De plus, les productions volumétriques sont nettement améliorées grâce aux très hautes densités cellulaires atteintes (M. C. Dalm, Cuijten, Van Grunsven, Tramper, & Martens, 2004; Jeng-Dar Yang, Yale Angelillo, Mina Chaudhry, Cindy Goldenberg, & David M Goldenberg, 2000). En dépit du fait que la majorité des protéines recombinantes soient produites en mode cuvée-alimentée, la perfusion reste le mode de culture idéal pour les biothérapeutiques instables en garantissant des temps de résidence relativement courts comparés aux autres modes de culture. C'est le cas, par exemple, des facteurs de coagulation VIII Kogenate® (Bayer), ReFacto® (Pfizer) et de quelques anticorps monoclonaux tels que Campath® (Sanofi), Remicade®, ReoPro® ou encore Stelara® (Janssen Biotech) (Ye Zhang, 2017). Les cultures en perfusion sont opérées jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^7 - 10^8 cells/mL (M. F. Clincke et al., 2013; M. C. Dalm et al., 2004; Y. Han et al., 2006; X. Liu et al., 2006). En théorie, un tissu peut contenir jusqu'à 10^9 cells/mL, ce qui suggère que l'on peut encore accroître la quantité de biomasse cultivée tout en tenant compte du transfert de masse O_2/CO_2 et de la capacité de rétention cellulaire de l'outil utilisé (Chu & Robinson, 2001; Ozturk, 1996). Il faut également considérer des taux de perfusion élevés nécessaires pour atteindre de hautes concentrations cellulaires et de ce fait, la dilution engendrée quant au titre en produit final (Jeng-Dar Yang et al., 2000). Finalement, la perfusion nécessite plus d'équipements (pompes, dispositif de rétention), implique une mise à l'échelle plus complexe et requiert également un temps plus long pour l'optimisation et la validation en raison de la durée des cultures (Kadouri & Spier, 1997; Kretzmer, 2002). Cependant, elle reste un moyen attrayant pour les industriels grâce aux différents avantages offerts : de hautes concentrations cellulaires, des productions volumétriques plus élevées, des temps de résidence courts (<24h) et un système de culture quasi stationnaire (John Bonham-Carter & Shevitz, 2011; Croughan, Konstantinov, & Cooney, 2015; Langer, 2011). De plus, selon une estimation des coûts de production d'une quantité de 500 kg/an avec un équipement à usage unique, on évalue le coût engendré en mode perfusion à 33.1\$ millions de dollars comparé à 106.7\$ millions de dollars en

mode cuvée-alimentée (Langer & Rader, 2014). Avec les diverses avancées technologiques notamment au niveau de l'instrumentation et dispositifs de rétentions, l'adoption des cultures en perfusion est appelée à prendre plus d'ampleur au niveau industriel dans les prochaines années (Croughan et al., 2015).

La perfusion peut être réalisée par une alimentation et un soutirage continu ou périodiques afin de maintenir un volume constant dans le bioréacteur. D'autre part, le dispositif de rétention cellulaire représente l'élément clé pour aboutir à de hautes concentrations cellulaires. Ce dispositif doit garantir une séparation efficace à des débits de perfusion élevés et ce, sur de longues périodes de culture (Woodside, Bowen, & Piret, 1998), sans compromettre la viabilité cellulaire à cause d'un cisaillement excessif. Il existe principalement deux types de séparation cellulaire qui consiste soit à immobiliser des cellules dans une matrice ou une membrane continuellement perfusée soit à les séparer par un dispositif défini. Les modules de séparation les plus communément utilisés sont basés sur la filtration, la centrifugation ou la décantation. Des réacteurs de 500L équipés de filtre centrifuge (*spin filter*) sont utilisés pour la production de Remicade® et de Reopro® chez Janssen Biotech (Pollock, Ho, & Farid, 2013), par exemple. Dans le cas des cellules immobilisées, l'homogénéisation de la culture est critique afin de garantir le même environnement dans le réservoir de culture et dans la matrice où se trouvent les cellules. Pour une telle perfusion, on parle alors des bioréacteurs à fibres creuses ou multicouches où les cellules sont fixées sur des micro-porteurs ou des fibres creuses. Par ailleurs, certaines limitations comme l'hétérogénéité du système (gradient de nutriment, échanges gazeux limités ou accumulation de cellules mortes) peuvent rendre potentiellement difficile la mise à l'échelle de tels dispositifs de culture. C'est pour cela qu'on privilégie la filtration à l'échelle industrielle. La filtration à flux tangentiel (TFF pour *tangential flow filtration*) consiste en un écoulement tangentiel qui limite le colmatage du filtre et garantit des temps d'utilisation relativement plus importants. La filtration tangentielle alternée (ATF pour *alternating tangential flow*) quant à elle est basée sur le même principe que la TFF, excepté que le milieu de culture est aspiré à travers le filtre et repoussé vers le réacteur par une pompe à diaphragme qui fonctionne de manière périodique en utilisant le vide et l'air comprimé. Clincke et son équipe (M.-F. Clincke et al., 2011) ont démontré que l'utilisation de la TFF dans une culture de cellules CHO a permis d'atteindre une densité cellulaire supérieure à 200×10^6 cells/mL comparé à 132×10^6 cells/mL avec l'ATF. Par ailleurs, d'après une étude hydrodynamique comparative entre l'ATF et TFF, le stress cellulaire est moindre avec l'ATF dans les mêmes

conditions d'agitation et de transfert d'oxygène. De plus, la rétention en anticorps est plus importante dans le cas de la TFF (environ 50%) (Karst, Serra, Villiger, Soos, & Morbidelli, 2016).

Parmi les approches établies pour l'optimisation des cultures en perfusion, celles visant à atteindre de hautes concentrations cellulaires sont les plus populaires garantissant ainsi des productions volumétriques importantes. Par ailleurs, les limitations en oxygène et en transfert de masse, en plus de l'accumulation en CO₂ sont généralement observées dans les cultures à grande échelle. Dans le cas de production non associée à la croissance, le procédé de perfusion peut être partagé en deux phases (bi-phasique), avec une phase de croissance pour atteindre une haute densité cellulaire suivie d'une phase de production où la densité cellulaire est maintenue par hypothermie ou par soutirage partiel du milieu de culture (Ahn et al., 2008; C Fenge, Fraune, & Schügerl, 1992). La définition de haute concentration cellulaire en perfusion peut différer selon les recherches. Certaines études recommandent un optimum entre 40-80 x10⁶ cells/mL pour atteindre de hautes productions volumétriques (Konstantinov et al., 2006), d'autres ont réussi à maintenir des densités cellulaires entre 100 et 200 x10⁶ cells/mL (Ye Zhang, 2017). Selon la stratégie de culture, le taux de perfusion est un paramètre important à prendre en considération. Les cultures à haut débit de perfusion sont souvent sujettes à une dilution du produit d'intérêt, mais aussi à une faible capacité de rétention cellulaire due au lavage de la membrane. On préconise ainsi de bas débits volumétriques afin de réduire les coûts et de faciliter la gestion des volumes de culture (Nivitchanyong et al., 2007). Une des stratégies employées pour réduire le débit de perfusion est de maintenir un état hypothermique afin de ralentir la croissance et réduire ainsi les besoins cellulaires (Gambhir, Zhang, Europa, & Hu, 1999). Dans leurs travaux, Konstantinov et al. (Konstantinov et al., 2006) ont réduit le débit de perfusion graduellement en définissant le débit maximal relatif à la limite de rétention cellulaire du module de séparation et le débit minimal est établi en fonction du temps de résidence maximal idéal pour la protéine d'intérêt. Cette stratégie de culture est généralement recommandée pour les lignées dont la production est non-associée ou inversement proportionnelle à la croissance. Par exemple, Goudar et al. (Goudar et al., 2006) ont amélioré le titre en protéine et réduit les coûts de production en utilisant la même approche sur une lignée CHO ayant comme caractéristique d'avoir une production non-associée à la croissance.

Afin de pousser encore plus loin les limites du mode de culture en perfusion, certains chercheurs ont développé des stratégies de perfusion alimentée afin de réduire le débit de perfusion et minimiser la dilution du produit. Avec cette approche, la culture est alimentée pour compenser la déplétion de nutriments essentiels et est perfusée pour maintenir les sous-produits toxiques à de

faibles niveaux. Comparé au mode cuvée-alimentée et à la perfusion, la productivité peut être améliorée. Bien que l'avantage de ce mode de culture soit évident, définir une stratégie d'alimentation permettant une utilisation optimale des nutriments clés reste encore laborieuse (Qiang Feng et al., 2006). Selon l'approche de Yang et son équipe (Jeng-Dar Yang et al., 2000), le débit d'alimentation de la solution concentrée est déterminé selon la consommation en glucose. Les rapports stœchiométriques doivent alors être stables pendant la culture pour éviter l'absence ou le gaspillage de nutriments essentiels. L'amélioration du rendement en anticorps obtenue a été attribuée à l'effet combiné de l'augmentation de la densité cellulaire et de la réduction de la dilution en produit final. Dans l'étude de Feng, l'ajout d'une solution concentrée d'acides aminés dans un procédé de perfusion-alimentée a été contrôlé par la variation de l'OUR durant la perfusion. La densité cellulaire atteinte dépassait 1.9×10^7 cells/mL et le titre en anticorps était 2 fois supérieur comparé aux modes cuvée-alimentée et perfusion (Qiang Feng et al., 2006). De son côté, l'équipe de Teng (Teng, Yi, Sun, & Zhang, 2011) a établi un modèle combiné afin de contrôler une culture de cellules CHO en mode perfusion-alimentée. L'opération d'alimentation est contrôlée par un modèle visant à supplémer avec exactitude les nutriments dont la cellule a besoin alors que l'opération de perfusion est régie par un deuxième modèle qui a pour but de maintenir les déchets métaboliques à un bas niveau. La densité cellulaire atteint 13×10^9 cells/L (1.3X plus qu'en simple perfusion) et la production en protéine est améliorée d'un facteur 2.

Toujours dans le but d'améliorer la performance des cultures cellulaires, un autre mode d'opération hybride a été proposé dans lequel la perfusion est réalisée lors des premiers jours de culture suivie par la suite de l'application du mode cuvée-alimentée. Par cette approche, Hiller et al. (Gregory W Hiller, Ana Maria Ovalle, Matthew P Gagnon, Meredith L Curran, & Wenge Wang, 2017) ont réussi à améliorer de manière considérable les titres en produit (jusqu'à 12g/L pour certains clones) grâce à une nette augmentation de la densité cellulaire viable.

CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Lignée cellulaire et conditions de culture

La lignée cellulaire inductible CHO-BRI/rcTA- glutamine synthétase fournie par le Conseil National de Recherches du Canada (CNRC- Montréal, Canada) a été utilisée dans ce projet (Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017). Cette lignée exprime de façon stable un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 (commerciallement appelé Rituximab) par le biais d'une technologie offrant un commutateur génétique qui permet de déclencher rapidement l'expression d'une protéine recombinante en réponse à la présence d'un régulateur spécifique et non toxique, le cumate (Figure 3.1).

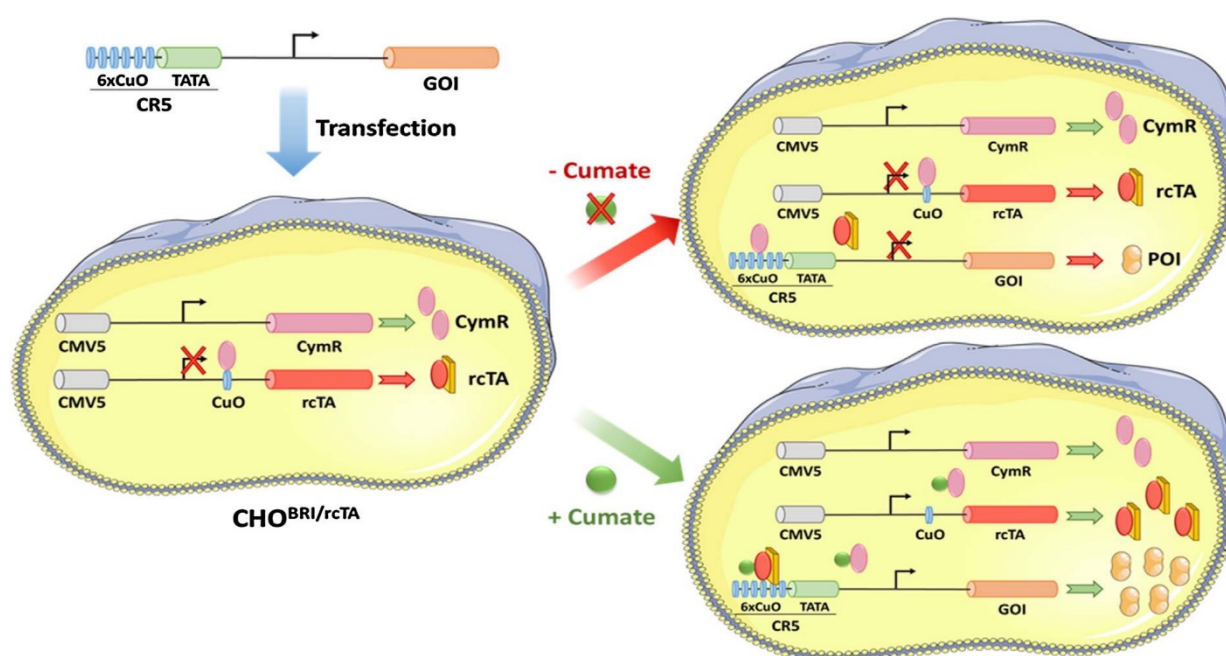


Figure 3.1: Le système inductible au cumate (Poulain et al., 2017)

Le vecteur d'expression de la lignée est composé d'un promoteur régulant l'expression de la protéine d'intérêt via la fixation d'un trans-activateur (rcTA). Le répresseur CymR est exprimé de manière continue et se fixe sur une section opératrice qui contrôle l'expression du trans-activateur nécessaire pour l'expression de la protéine d'intérêt. L'ajout de cumate fait qu'il se lie au répresseur CymR conduisant ainsi au changement de sa configuration. Par conséquent, il ne se fixe plus sur la section opératrice et le trans-activateur est exprimé. Par la suite, la formation du complexe

«cumate-CymR-rcTA» et sa fixation sur le promoteur CR5 induit l'expression de la protéine d'intérêt (Mullick et al., 2006).

Dans le cadre de cette étude, les cellules CHO inductibles au cumate utilisées produisent un anticorps monoclonal communément appelé Rituximab. Ce dernier est utilisé pour traiter les lymphomes non-hodgkiniens et quelques leucémies aiguës (S. H. Lim et al., 2010). Ses principaux mécanismes d'action sont l'ADCC et surtout le CDC. Les analyses de glycosylation montrent que les espèces de glycans les plus abondantes sur cet anticorps sont G0F (glycans agalactosylés fucosylés), G1F et G2F (glycans mono- et di-galactosylés fucosylés, respectivement) (McLeod, 2010; Raju & Jordan, 2012). L'étude d'Anumula et al. (Anumula, 2012) rapporte que les glycans retrouvés chez l'humain sont à 95% fucosylés. De plus, les fractions de glycans mono- et di-galactosylés sont de l'ordre de 38% et 21%, respectivement, alors que les fractions sialylées ne représentent que 5-15%. Comme mentionné précédemment, le pourcentage de galactosylation influence de manière directe l'action par CDC. Ainsi, le but lors de la production *ex vivo* de telles glycoprotéines est d'avoir un produit avec un profil se rapprochant des anticorps humains afin d'éviter tout effet immunogène, en plus de garantir une haute fraction galactosylée pour avoir une réponse immunitaire efficace. Cela dépend évidemment de la stratégie de culture, de la composition du milieu, mais également de certaines conditions opératoires.

3.1.1 Maintenance des cellules

Les cellules sont stockées dans un milieu chimiquement défini (Power CHO, Lonza-USA) contenant 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) (Sigma Life Science, USA) et 10% de dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, USA) et placées dans de l'azote liquide. La décongélation se fait dans un bain-marie et les cellules sont directement re-suspendues dans 10 mL de milieu frais Power CHO contenant 50 μ M methionine sulfoximine (milieu de maintenance). Le flacon (Corning, USA) est alors incubé à 37 °C et 5% CO₂, sous une agitation orbitale de 120 rpm. Chaque deux jours, les cellules sont diluées à 0.2x10⁶ cells/mL dans le milieu de maintenance préchauffé à 37°C.

3.1.2 Cultures en flacons

Des flacons de 125 mL (Corning, USA) ont été utilisés pour les expériences à petite échelle. Les cellules sont inoculées à $0.2-0.5 \times 10^6$ cells/mL dans 20 mL de BalanCD growth A (Irvine Scientific, USA) supplémenté de 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) et 0.3% pluronic F68 (Sigma Aldrich, USA). Pour initier la production de la protéine d'intérêt, 2 μ g/mL de cumate (Sigma Aldrich, USA) est rajouté aux cultures et, si nécessaire, la température est réduite (30-34 °C) durant toute la phase de production. Les cultures en mode cuvée-alimentée sont effectuées par l'ajout d'une solution commerciale concentrée et chimiquement définie IS CHO-CD F12.7 (Irvine Scientific, USA). Le volume de solution concentrée à supplémenter aux cultures est régi par l'équation suivante (F. Lu et al., 2013) :

$$\text{Volume alimenté [L]} = \frac{\text{Consommation prédite de glucose [mmol]}}{\text{Concentration de glucose dans l'alimentation [mmol/L]}}$$

La consommation prédite de glucose est elle-même calculée à partir de l'équation suivante:

$$\text{Consommation prédite [mmol]} = q_t (IVC_{t+1}) - (C_t V_t - C_{sp} V_t)$$

où q_t désigne le taux de consommation de glucose, IVC_{t+1} est l'intégrale des cellules viables prédite au moment du prochain ajout (en assumant un taux de croissance constant), C_t est la concentration de glucose, C_{sp} est la consigne de glucose et V_t le volume de culture. Le taux de consommation de glucose est calculé par :

$$q_t \left[\frac{\text{mmol}}{\text{cell.d}} \right] = \frac{C_{t-1} V_{t-1} - C_t V_t + F_{t-1} C_{feed}}{IVC_t}$$

où F_{t-1} désigne le volume de solution concentrée ajouté précédemment et C_{feed} est la concentration de glucose dans la solution concentrée (175 mM). La consigne de glucose (C_{sp}) était fixée habituellement à 35 mM, ce qui correspond au niveau contenu dans le milieu basal, sauf mention contraire.

Les flacons sont placés dans un environnement humidifié avec 5% de CO₂ et sous une agitation orbitale de 120 rpm pendant la phase de croissance et 160-170 rpm pendant la phase de production.

Les échantillons récoltés à chaque jour sont centrifugés à 2000g pendant 5 min et les surnageants sont stockés à -30 °C pour les analyses adéquates. Pour les cultures en mode perfusion, un soutirage discontinu du milieu de culture (contenant les cellules) est réalisé de manière journalière. Après centrifugation, les cellules sont re-suspendues dans du milieu BalanCD growth A frais.

3.1.3 Cultures en bioréacteur

Les expériences ont été réalisées dans des bioréacteurs de 2 L (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland) avec un volume initial de travail de 0.5 L. Un agitateur à hélices marines assure l'homogénéité de la culture et le maintien continu des cellules en suspension. La température est contrôlée à la valeur désirée en utilisant la circulation d'un liquide dans la double-enveloppe du bioréacteur. Le pH est régulé à 7 par injection de CO₂ ou par addition d'une solution basique d'hydroxyde de Sodium (NaOH, 1N). La concentration en oxygène dissous est maintenue entre 40 et 50 % de saturation en injectant un mélange d'air-azote et si nécessaire de l'oxygène pur avec un débit de 100 mL/min. Le bioréacteur est stérilisé à 121 °C pendant 1 h. Après refroidissement, une partie du milieu de culture basal est transféré dans la cuve pour la calibration des sondes. Par la suite, les cellules sont inoculées dans le reste de milieu basal et transférées dans le bioréacteur, ce qui représente le temps zéro de la culture.

3.2 Méthodes analytiques

3.2.1 Détermination de la concentration cellulaire et de la viabilité

La densité cellulaire ainsi que la viabilité ont été déterminées par la méthode d'exclusion au trypan bleu (Sigma). Cette méthode consiste à mélanger 25 µL de trypan bleu avec 100 µL d'échantillon de culture. Après avoir disposé le mélange sur un hémacytomètre, un microscope optique est utilisé pour le comptage.

3.2.2 Mesure des concentrations de glucose, lactate et ammoniacque

Les concentrations en glucose et en lactate ont été mesurées à l'aide d'un analyseur biochimique YSI 2700 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH). Le principe de l'analyse est basé sur une réaction enzymatique entre le métabolite et son enzyme de dégradation. Le produit de cette réaction est par la suite quantifié sur une électrode en platine et converti en concentration lisible

sur l'afficheur de l'appareil. La quantité d'ammoniaque produite lors des cultures a été quant à elle déterminée en utilisant un Kit commercial (AA0100-1KT, Sigma-Aldrich).

3.2.3 Méthodes de quantification des anticorps

Deux techniques ont été employées afin de quantifier les anticorps monoclonaux produits lors des cultures :

- *La résonance plasmonique de surface* (SPR) est une technique basée sur la mesure en temps réel de l'interaction entre un analyte et son ligand. Dans ce cas de figure, le Biacore™ T100 (GE Healthcare) a été utilisé. Suivant la méthode décrite dans le travail de Dorion-Thibaudau et al. (Dorion-Thibaudau et al., 2014; Dorion-Thibaudau, St-Laurent, Raymond, De Crescenzo, & Durocher, 2016), la courbe de calibration a été réalisée en injectant des dilutions prédéfinies d'un standard rituximab. Par la suite, 1600 RU de Ecoil-FCγRI ont été immobilisées sur une surface Kcoil à un débit de 30 µL/min pendant 20 s. Une fois cette étape terminée, les surnageants de culture sont injectés à un débit de 5 µL/min pendant 60 s suivi de la solution tampon (HBS-P 1x, pH 7.4) avec le même débit pendant 3 min. La régénération de surface est réalisée avec injection de Guanidium/HCL 6 M à 100 µL/min durant 30 s.

- La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : une colonne protéine A (POROS® A20 column, 2.1 mmD x 30 mmH, 104 µL, Invitrogen, Grand Island, NY) a été utilisée. Les échantillons de culture ont été préalablement centrifugés à 8000g-11000g pendant 3 min avec NANOSEP MF GHP 0.45 µm (PALL Life Sciences). L'injection dans la colonne a été effectuée avec un débit de 2 mL/min et l'opération d'élution s'est effectuée avec une solution de NaCl 0.15 M, pH 2.0. La détection par ultra-violet s'est faite à 280 nm.

3.2.4 Opération de purification des anticorps

Une colonne protéine A (ESHMUNO®, MiniChrom column, Eshmuno® A, 1mL, Merck) a été utilisée pour la purification des anticorps. Une première étape d'équilibration a été réalisée avec une solution tampon avant injection de l'échantillon à un débit de 1.5 mL/min est suivie d'une étape de lavage de la colonne pour éliminer toutes les impuretés non retenues par la résine. Les anticorps sont enfin élués au même débit que l'injection avec un tampon de glycine 20 mM, pH4.

Les fractions collectées sont reconcentrées et transférées dans de l'eau en utilisant des Amicon Ultra 4, 3K falcon (Millipore).

3.2.5 Analyse de la distribution des glycans

La distribution des glycans a été déterminée par chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC). Tout d'abord, les anticorps sont dénaturés en les incubant à 37 °C pendant 24h avec l'enzyme PNGase F. L'échantillon est ensuite marqué avec du 2-aminobenzamide (2-AB) avant d'être injecté dans la colonne TSKgel Amide-80. L'élution des glycans est réalisée avec une solution de formate d'ammonium 100 mM à pH 4.5 (solvant A) et une solution d'acétonitrile 100% (solvant B). Le chromatogramme obtenu a été étalonné par rapport au 2AB-dextran marqué et a été comparé aux valeurs GU dans glycobase.nibrt.ie/glycobase/. Les aires sous les pics de N-glycans marqués par 2-AB ont été utilisées pour calculer l'abondance relative des espèces.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : PROCESS DEVELOPMENT FOR AN INDUCIBLE RITUXIMAB-EXPRESSING CHO CELL LINE

4.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente l'article scientifique intitulé '*Process Development for an Inducible Rituximab-Expressing CHO Cell Line*'. Cet article a été soumis pour publication dans le journal *Biotechnology Progress*.

Dans ce manuscrit, nous avons comparé les performances d'un système CHO inductible au cumate en procédant à des inductions à différentes densités cellulaires au cours de cultures opérées en modes cuvée et cuvée-alimentée. Une stratégie d'alimentation dynamique a été employée dès le premier jour des cultures cuvée-alimentée. Les cinétiques de croissance, de consommation de substrat, de production de métabolites ainsi que les rendements en produit ont été étudiés. Il ressort que la croissance cellulaire et les rendements en produit ont augmenté considérablement en mode cuvée-alimentée comparé au mode cuvée. De plus, l'étude révèle l'importance du moment d'induction, puisqu'induire à faible ou à haute densité cellulaire conduit à une réduction de la production volumétrique. Une culture effectuée en bioréacteur a conduit à des résultats comparables aux cultures en flacons. D'autre part, une analyse de la distribution de glycanes de l'anticorps produit indique que les fractions glycaniques ne semblent pas être affectées par la densité cellulaire à l'induction mais varient plutôt en fonction du temps de culture.

Kahina Mellahi^a, Florian Cambay^a, Denis Brochu^b, Michel Gilbert^b, Michel Perrier^a, Sven Ansorge^c, Yves Durocher^c and Olivier Henry^{a*}

^a Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

^b Human Health Therapeutics Research Center, National Research Council Canada, Ottawa, Canada

^c Human Health Therapeutics Research Center, National Research Council Canada, Montréal, Canada

*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address: olivier.henry@polymtl.ca

4.2 Abstract

Inducible mammalian expression systems are becoming increasingly available and are not only useful for the production of cytotoxic/cytostatic products, but also confer the unique ability to uncouple the growth and production phases. In this work, we have specifically investigated how the cell culture state at the time of induction influences the cumate-inducible expression of recombinant rituximab by a GS-CHO cell line. To this end, cells grown in batch and fed-batch cultures were induced at increasing cell densities (1 to 10×10^6 cells/mL). In batch, the cell specific productivity and the product yield were found to reduce with increasing cell density at induction. A dynamic feeding strategy employing a concentrated nutrient solution applied prior and post induction allowed to significantly increase the integral of viable cells and led to a 3-fold increase in the volumetric productivity (1.2 g/L). The highest product yields were achieved for intermediate cell densities at induction, as cultures induced during the late exponential phase (10×10^6 cells/mL) were associated with a shortened production phase. The final glycosylation patterns remained

however similar, irrespective of the cell density at induction. The kinetics of growth and production in a 2L bioreactor were largely comparable to shake flasks for a similar cell density at induction. The degree of galactosylation was found to decrease over time, but the final glycan distribution at harvest was consistent to that of the shake flasks cultures. Taken together, our results provide useful insights for the rational development of fed-batch cell culture processes involving inducible CHO cells.

Key words: CHO cells, inducible expression, fed-batch culture, antibody titer, glycosylation.

4.3 Introduction

In recent decades, we have witnessed a significant increase in the production of therapeutic proteins derived from cell culture processes. The biopharmaceutical market has grown to 140\$ billion (B. C. Mulukutla, Yongky, Le, Mashek, & Hu, 2016). Nowadays, there are more than 400 marketed recombinant products and around 1300 other undergoing clinical trials (Sanchez-Garcia et al., 2016). The major products include monoclonal antibodies, vaccines, interferons, hormones and growth factors. The production yields of these biological products have significantly increased over the years, due to significant improvements in process engineering and cell expression systems. Recombinant protein may be produced by a wide range of expression platforms, but mammalian cells remain the major hosts for the production of high-value proteins due to their ability to perform post-translational modifications and successful protein folding (J. Zhu, 2012). Chinese hamster ovary (CHO) cells remain the preferred expression system for large scale biomanufacturing. Many advantages can be attributed to this cell system such as a large adaptability to the culture conditions, short generation time, the capacity to synthesize complex proteins, to grow at high cell density in bioreactor and their ease of genetic manipulation (Cacciatore et al., 2010).

Since the production of antibody is typically non-growth associated (F. W. Lee, Elias, Todd, & Kompala, 1998; F. Li et al., 2010; Lipscomb, Mowry, & Kompala, 2004), extensive efforts have been directed towards the development of biphasic culture strategies. In such processes, cells are initially grown to a high cell density and this is followed by a production phase during which cell growth is ceased or slowed down to enhance protein production (Templeton et al., 2013; Young, 2013). In most cases, a temperature switch to mild-hypothermia conditions is used to transition between the two phases (H. Kim & G. M. Lee, 2007; Takahashi et al., 1994), but other strategies use addition of reagents like sodium butyrate (NaBu) (N. S. Kim & Lee, 2000; Yuanxing Zhang, 2009) or dimethyl sulfoxide (DMSO) during the culture to slow down cell growth and provide a longer production phase (C.-H. Liu et al., 2001).

Inducible mammalian expression systems can also be employed for controlling protein expression. The most common used regulatory systems are the tetracycline- (Gossen & Bujard, 1992; Lam et al., 2017; Misaghi et al., 2014) and ecdysone-inducible systems (No et al., 1996), but recent studies have also highlighted the use of the cumate gene-switch system (Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017). With the capacity to trigger the expression of the protein of interest, inducible systems confer the ability to decouple the growth and production phases. This can provide more opportunities for process optimization, as enhanced culture conditions can be defined specifically for each phase. To achieve a desired product titer, both the cell specific productivity and the integral of viable cells should be maximized (Dietmair et al., 2012; Y. M. Huang et al., 2010; F. Lu et al., 2013; L. Zhang et al., 2004). In that endeavor, selecting a medium formulation and a culture operating mode that can support high cell density and promote cell productivity is essential. Fed-batch culture is typically the preferred operating mode, owing to its flexibility and ease of scale-up (Zhou, Chen, et al., 1997). The challenge for this mode of operation lies in the development of

effective feeding strategies; the amount of nutrients to be added depends on the cells' consumption rate, which in turn depends on their metabolism and the culture environmental conditions.

While efficient mammalian inducible cell systems are becoming increasingly available, very little information is available in the open literature regarding process development for these types of systems. In this work, we have investigated how the operating mode and the culture conditions at the time of induction influences the cumate-inducible expression of recombinant rituximab by a GS-CHO cell line. To this end, cells grown in batch and fed-batch cultures were induced at increasing cell densities (1 to 10×10^6 cells/mL) and the resulting kinetics of growth and production were analyzed. The product glycosylation profile was also characterized and compared between intermediate and high cell density at induction to assess the impact on product quality.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Cell line and shake flask culture conditions

A recombinant cumate-gene switch CHO clone (CHO BRI-rcTA) was used in this study (Poulain et al., 2017). It is a glutamine synthetase (GS) cell line stably producing the monoclonal antibody Rituximab. This cell line is induced via the addition of cumate, a small non-toxic molecule, which triggers the stable expression of the product using the reverse activator configuration of the cumate-gene switch described in details by Mullick *et al.* (Mullick et al., 2006). This expression system exhibits very low basal expression levels in the repressed state and high expression upon induction with cumate. The inoculum train was started from vial thawed and expanded in 125mL shake flask and passaged regularly in Power CHO2 (Lonza, USA) medium supplemented with 50μM methionine sulfoximine (MSX) (Sigma Life Science, USA). Cells were kept in a CO₂ incubator (HERA CELL 240i, Thermo Scientific) at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cultures in shake flask were inoculated at 0.2×10^6 cells/mL in BalanCD Growth A (Irvine Scientific, USA) production medium supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) and 0.3% pluronic F68 (Sigma Aldrich, USA). Culture induction was performed by adding 2 μ g/mL cumate (Sigma Aldrich, USA) and temperature was shifted from 37 °C to 34 °C at induction time for the duration of the production phase. One-day post-induction, 0.05 mg/mL of dextran sulfate (Sigma Life Science, USA) was added to the cultures. Fed-batch cultures were performed using the IS CHO-CD F12.7 (Irvine Scientific, USA) feed media that contains 175 mM of glucose and supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX), 0.3% of Kolliphor (Sigma Aldrich, USA) and 2 μ g/mL of cumate. Starting on day 1, bolus additions were performed on a daily basis, based on the measured glucose consumption rate and the predicted biomass growth (F. Lu et al., 2013). The amount of concentrated feed solution added to the cultures was thus adjusted so as to maintain glucose at a prescribed set-point (30-35 mM) similar to the concentration of the basal medium. Flask cultures were harvested when the cell viability dropped below 20 %, but culture supernatants were also collected at an earlier time-point (corresponding to >95 % cell viability) to assess the impact of culture duration on product quality. All batch and fed-batch shake flask cultures were conducted in duplicate for each condition. Samples were collected daily and centrifuged at 2000g for 5min and stored at -30 °C for subsequent analysis.

4.4.2 Bioreactor culture conditions

Cells were grown in a bench scale 2L stirred bioreactor (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland) operated at a 0.5 L starting volume and inoculated at 0.5×10^6 cells/mL. Culture induction was performed on day 3 when the cells reached a density of 4×10^6 cells/mL and the temperature was shifted from 37 °C to 34 °C during the production phase. The feeding strategy was

performed as described above for the shake flask cultures. The concentrated nutrient solution was fed using a peristaltic pump at a flow rate of 10 mL/min. Dissolved oxygen was controlled at 40% by surface aeration through the delivery of a gas mixture of air, nitrogen and pure oxygen when necessary. The total gas flow rate was set at 100 mL/min. Agitation was started at 90 rpm and was increased to 120 rpm during the production phase to improve the oxygen transfer. The pH set point was maintained at 7.0 during the culture by 1N sodium hydroxide addition or surface gassing of CO₂.

4.4.3 Analytical methods

Cell concentration and viability measurements were performed by the trypan blue exclusion method using a hemocytometer and a standard light microscope. Glucose and lactate concentrations were measured off-line with a biochemistry analyzer YSI 2700 model (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH). Ammonia concentration was quantified using an enzymatic assay kit (AA0100-1KT), Sigma-Aldrich).

4.4.4 Antibody quantification

Antibody quantification was performed by surface plasmon resonance (SPR) using a Biacore™ T100 instrument (GE Healthcare) following the method described by Dorion-Thibaudeau *et al.* (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Dorion-Thibaudeau et al., 2016). Briefly, HBS-P 1x at pH 7.4 was used as running buffer and the calibration curve was generated by injecting dilutions of a purified Rituximab standard. 1600 RU of Ecoil-tagged FcγRI (CD64) (20 ug/mL) were immobilized on a Kcoil surface at 30 μL/min for 20 s. Supernatant samples were then injected at 5 μL/min during 60 s followed by running buffer loading at the same flow rate for 3 min. Surface regeneration was performed by injecting Guanidium/HCl 6 M at 100 μL/min for 30 s. Linear regression between 5 and 55s of the Mab injection over captured CD64 receptors was performed

in order to determine the initial binding rate of antibody concentrations ranging between 0.2 and 25 nM (n=10).

4.4.5 Antibody purification

Anti-CD20 monoclonal antibody purification was performed with a protein A chromatography using an Akta Explorer System (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC). Cell culture samples were centrifuged at 2000g for 5 min and filtered with 0.22 µm filter (Millipore). The supernatants were then mixed with a loading buffer solution. The protein A (ESHMUNO®, MiniChrom column, Eshmuno® A, 1mL, Merck) column was first equilibrated with the buffer solution before sample injection at a flow rate of 1.5 mL/min. Elution was performed at the same injection flow rate using 20 mM Glycine pH 4 buffer. The collected fraction was buffer-exchanged against water using Amicon Ultra-4 filter device (Millipore). Samples were then stored at -20 °C for subsequent quality analysis.

4.4.6 Glycan analysis by HILIC

Glycan distribution was determined by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC). The protein samples were denatured using PNGase F at 37 °C for 24 h in order to release the glycans. Prior to injection on the TSKgel Amide-80 column, samples were labelled with 2-aminobenzamide (2-AB). Glycans were then eluted with 100mM ammonium formate at pH 4.5 (solvent A) and 100% acetonitrile (Solvent B). The obtained fluorescence chromatogram of HILIC separation was calibrated against a 2AB-labeled dextran ladder and compared to GU values in glycobase.nibrt.ie/glycobase/. The peak areas of 2-AB-labeled N-linked glycans were used to calculate the relative abundances.

4.4.7 Specific rates calculation

The average cell specific glucose and lactate uptake/production rates were calculated during the growth and production phases by considering two 48h periods (pre- and post-induction), according to the following equations (Sauer, Burky, Wesson, Sternard, & Qu, 2000):

$$q_{glc}^{ave} = \frac{(glc_{t_{initial}} * V_{t_{initial}} - glc_{t_{final}} * V_{t_{final}}) + \sum V_f * glc_f}{\int_{t_{initial}}^{t_{final}} X_v V dt}$$

$$q_{lac}^{ave} = \frac{(lac_{t_{initial}} * V_{t_{initial}} - lac_{t_{final}} * V_{t_{final}})}{\int_{t_{initial}}^{t_{final}} X_v V dt}$$

where glc_t , lac_t and V_t are respectively, the glucose concentration, lactate concentration and culture volume at time t , glc_f is the glucose concentration in the feed, and V_f is the volume of feed added to the culture. The average cell specific monoclonal antibody production rate was calculated by dividing the final antibody titer (i.e. at harvest) by the integral of viable cells (Sauer et al., 2000):

$$q_{mAb} = \frac{C_{final}^{mAb}}{\int_{t_{initial}}^{t_{final}} X_v V dt}$$

In addition, the galactosylation and sialylation indices were determined using the respective proportion of each component according to the equations below (Villacrés, Tayi, Lattová, Perreault, & Butler, 2015):

$$GI = \frac{G2 + 0.5G1}{G0 + G1 + G2}$$

$$SI = \frac{S2 + 0.5S1}{S0 + S1 + S2}$$

Where G0, G1 and G2 are the relative fractions of the agalactosylated, mono-galactosylated and fully-galactosylated structures of the antibody, whereas S0, S1 and S2 correspond to the non-

sialylated, mono-sialylated and di-sialylated structures, respectively. Student's t-test was applied to determine the statistical significance of the results.

4.5 Results

4.5.1 Effect of the cell density at induction in batch cultures

The impact of the cell density at induction on cellular growth and productivity was first assessed in batch cultures that were induced at cell concentrations ranging from 1 to 10×10^6 cells/mL (Figure 4.1). The corresponding days of induction for all batch cultures are given in Table 4.1, along with the duration of the production phases. At the time of induction and the temperature shift, cell viability was above 90 % in all the cultures. The flasks that were induced at low and intermediate cell densities (up to 6×10^6 cells/mL) experienced significant growth post-induction and all reached a similar maximum viable cell concentration of around 9×10^6 cells/mL on day 6. In the culture induced at the highest cell density (10×10^6 cells/mL), no post-induction growth occurred, and the viable cell concentration was observed to drop sharply immediately after the onset of protein expression. As a result, the production phase lasted only 3 days. In contrast, cultures induced at lower cell densities exhibited much longer production phases, up to 8 days in the case of the culture induced at 1×10^6 cells/mL.

The corresponding glucose and lactate concentration profiles are plotted in Figure 4.2A and Figure 4.2B, respectively. As can be observed, glucose was consumed at a high rate during the exponential growth phase, while lactate accumulated in the culture medium. Irrespective of the induction time, the maximum lactate concentrations (9-10mM) were attained around day 4-5, and this was followed by a period during which cells concomitantly consumed glucose and lactate. The cell specific rates (growth, nutrient uptake, metabolite production) evaluated 48h before and after

induction are presented in Table 4.2. The induction and the concomitant temperature shift resulted overall in reductions of the cell specific rates when compared to the growth phase. As the cell density at induction increased, the glucose uptake rate was found to decrease, as well as the lactate production rate. The highest integral of viable cell concentration corresponded to the culture induced at low cell density due to the prolonged culture duration.

The ammonia concentration was measured at the end of the batch cultures (Figure 4.2C) and reached similar levels (2 mM) irrespective of the cell density at induction. The monoclonal antibody concentrations measured at harvest were in the range of 160 to 370 mg/L (Figure 4.2F), corresponding to average cell specific productivities of 3 to 5 pg/cell.d. The highest cell specific productivity, IVC and product titer were achieved when cultures were induced at the lowest cell density (Table 4.2), presumably due to the greater nutrient availability at the onset of the production phase. The supplementary Figure 4.S1 provides a comparison of the growth and product yields for an induced and a control (non-induced) batch culture. The final antibody titer was only 29 mg/L for a batch culture without induction, due to minor leaky basal expression and corresponding to an ON/OFF ratio of 6.

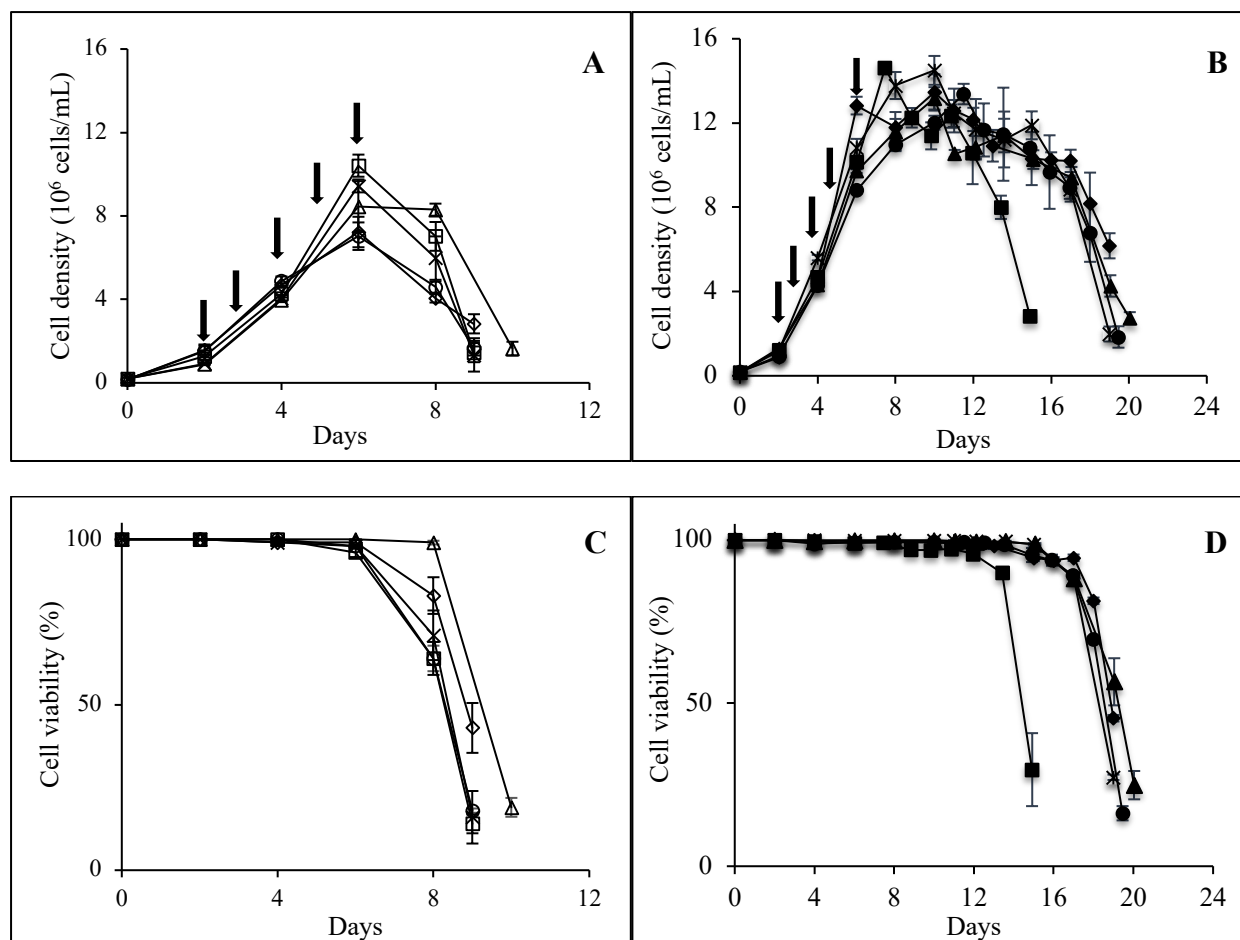


Figure 4.1: Viable cell concentration and cell viability profiles in batch (A, C) and fed-batch cultures (B, D). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (circle), 4×10^6 cells/mL (diamond), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square). Arrows indicate the induction time. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.

Table 4.1 : Time of induction and duration of the production phase for cultures induced at various cell densities in batch and fed-batch

Cell density at induction (10^6 cells/mL)	Batch cultures		Fed-batch cultures	
	Time of induction (d)	Production phase duration (d)	Time of induction (d)	Production phase duration (d)
1	2	8	2	18
2	3	6	3	18
4	4	5	4	15
6	5	4	4	15
10	6	3	6	9

4.5.2 Effect of the cell density at induction in fed-batch cultures

Since nutrient depletion can be one the key factor limiting cellular growth and productivity, a second set of experiments was carried out to assess the impact of operating the cultures in fed-batch. Daily bolus additions were made using a commercial concentrated feed solution. The dynamic feeding strategy was applied both prior- and post-induction. Cultures were induced at the same cell densities employed during the batch experiments. As the cell density at induction increased, the duration of the production phase was reduced in both batch and fed-batch cultures as shown in Table 4.1. Unlike in batch, all fed-batch cultures displayed a prolonged stationary phase (Figure 4.1B). Culture duration was extended and lasted up to 19 days for the cultures induced from 1×10^6 cells/mL to 6×10^6 cells/mL, which is 2 times longer than the duration of the

corresponding batch cultures. In addition, viability was kept well over 80% for up to 17 days in these cultures. However, an early and sudden drop was observed on day 12 for the culture that was induced at high cell density (10×10^6 cells/mL). In fact, despite reaching the highest peak in viable cell density (15×10^6 cells/mL), the early decrease in cell viability translated into a shorter culture duration compared to the other fed-batch cultures.

As mentioned before, the dynamic feeding strategy was based on the specific consumption rate of glucose and allowed to maintain its concentration between 30mM-35mM throughout the cultures (Figure 4.2D). Overall, the cell specific rates in fed-batch (Table 4.3) showed the same trends as those noted during batch cultures. The glucose uptake was associated with an initial high production rate of lactate which accumulated in the early phase of all the fed-batch cultures. The lactate concentration profiles were nearly identical until day 4 for the five fed-batch cultures (Figure 4.2E). Hence, the observed differences in the cell specific lactate production rates during the growth phase are related to the culture stage at which they were evaluated (i.e. the 48h period before each induction time). The lactate concentration profiles immediately post-induction are more clearly shown in a zoomed-in plot (Figure 4.S2) for all the fed-batch cultures. The cultures induced at 6×10^6 and 10×10^6 cells/mL started to consume lactate early during the production phase, albeit at a low rate (Table 4.3). Eventually, all the cultures resumed to accumulate lactate towards the end of the experiments. The lactate production rate was in the range of 0.2 to 0.3 pmol/cell.d when cell viability started to decline in all the fed-batch cultures. In a recent study by Xu et al., such lactate reproduction towards the late-stage of fed-batch culture was associated with the synergistic effects of pCO₂ levels, base addition and mixing conditions (Xu et al., 2018).

Ammonia was the other by-product significantly produced during the fed-batch cultures and reached a final concentration of around 5mM, a 2.5-fold increase compared to batch. Since the average cell specific ammonia production rate was in the same range for batch and fed-batch

cultures (0.04 pmol/cell.d), the increased accumulation of ammonia in the latter was a result of the higher cell concentrations and the extended duration of cultivation.

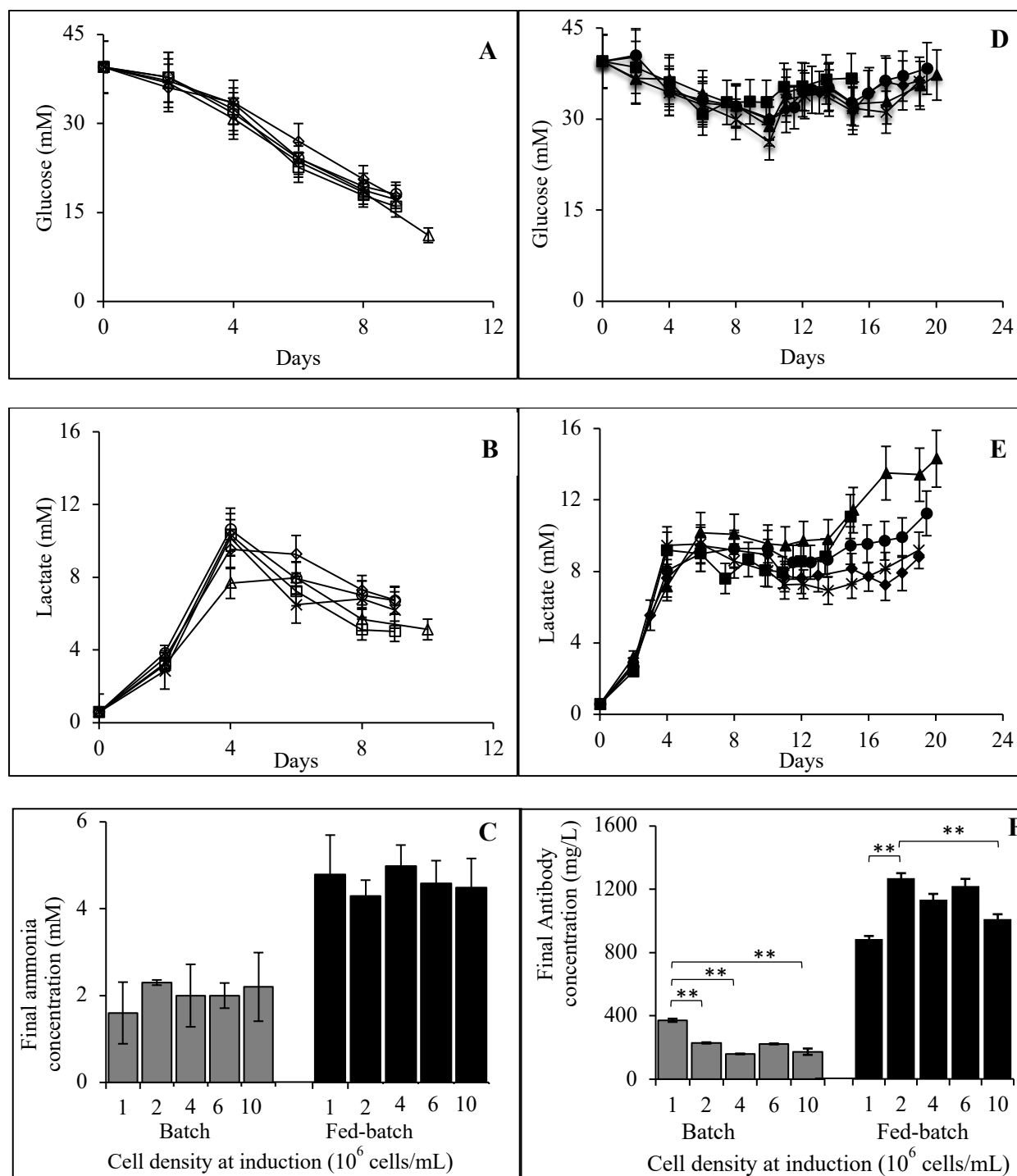


Figure 4.2 : Glucose and lactate concentrations profiles in batch (A, B) and fed-batch cultures (D, E). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (circle), 4×10^6 cells/mL (diamond), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square). Final ammonia concentrations (C) and final monoclonal antibody production (F) for batch (grey bars) and fed-batch cultures (black bars). Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $**p < 0.005$.

The final antibody titers achieved in fed-batch cultures (Figure 4.2F) induced at intermediate cell densities (2 to 6×10^6 cells/mL) were in the range of 1.1 to 1.2 g/L, a 3-fold increase compared to the maximum yields obtained in batch cultures. The corresponding average cell specific antibody production rates were 8.2 to 9.5 pg/cell.d, which were also significantly higher than those obtained in batch. However, the volumetric productivity for the cultures induced at the highest cell density was slightly reduced, as a result of the early drop in cell viability immediately post-induction. For these cultures, at the time of induction, the cells had already transition to lactate consumption. Cultures induced at the lowest cell density exhibited the lowest final product titer (0.85 g/L) and the lowest cell specific productivity (6 pg/cell.d). It should be emphasized that a temperature shift at the time of induction was systematically performed in all the batch and fed-batch cultures, since this has a determinant impact on culture productivity, as can be assessed by comparing the results obtained in fed-batch cultures induced at a similar cell density with and without (control culture) a temperature reduction during the production phase (Supplementary Figure 4.S1). A temperature shift to mild hypothermia conditions during the production phase led to extended culture longevity and enhanced the volumetric productivity by nearly a factor of 3.

Table 4.2 : Cell specific rates evaluated 48h prior- and post-induction in batch cultures. Values are mean \pm SD from duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $P < 0.05$ or ** $P < 0.005$ compared to the batch culture with the highest product yield (induction at 1×10^6 cells/mL).

	Cell density at induction (10^6 cells/mL)				
	1	2	4	6	10
μ_{ave_growth} (d^{-1})	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2
$\mu_{ave_production}$ (d^{-1})	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1	$0.2 \pm 0.1^*$	$0.00 \pm 0.2^*$	$-0.7 \pm 0.02^{**}$
q_{glc_growth} (pmol/cell.d)	-6.1 ± 1.1	$-2.0 \pm 0.4^{**}$	$-1.3 \pm 0.2^{**}$	$-1.3 \pm 0.2^{**}$	$-0.8 \pm 0.1^{**}$
$q_{glc_production}$ (pmol/cell.d)	-1.6 ± 0.2	$-0.5 \pm 0.1^{**}$	$-0.7 \pm 0.1^{**}$	$-0.5 \pm 0.1^{**}$	$-0.3 \pm 0.04^{**}$
q_{lac_growth} (pmol/cell.d)	3.6 ± 0.7	$1.8 \pm 0.4^*$	$1.1 \pm 0.2^{**}$	$0.4 \pm 0.1^{**}$	$-0.1 \pm 0.02^{**}$
$q_{lac_production}$ (pmol/cell.d)	0.9 ± 0.1	$0.3 \pm 0.05^{**}$	$-0.2 \pm 0.04^{**}$	$-0.2 \pm 0.03^{**}$	$-0.10 \pm 0.03^{**}$
IVCC (10^6 cell.d/mL)	74 ± 5.0	57 ± 3.7	$50 \pm 3.8^{**}$	61 ± 9.8	$57 \pm 5.9^*$
q_p (pg/cells.d)	5.0 ± 0.6	4.0 ± 0.4	$3.2 \pm 0.3^*$	3.7 ± 0.8	$3.1 \pm 0.7^*$

Table 4.3 : Cell specific rates evaluated 48h prior- and post-induction in fed-batch cultures. Values are mean \pm SD from duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $P < 0.05$ or ** $P < 0.005$ compared to the fed-batch culture with the highest product yield (induction at 2×10^6 cells/mL).

	Cell density at induction (10^6 cells/mL)				
	1	2	4	6	10
μ_{ave_growth} (d^{-1})	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.4
$\mu_{ave_production}$ (d^{-1})	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	$0.2 \pm 0.1^*$
q_{glc_growth} (pmol/cell.d)	$-7.0 \pm 1.2^{**}$	-2.7 ± 0.5	-2.7 ± 0.4	-2.1 ± 0.5	$-1.5 \pm 0.2^*$
$q_{glc_production}$ (pmol/cell.d)	-1.9 ± 0.3	-1.6 ± 0.3	-1.4 ± 0.2	-1.3 ± 0.2	-1.1 ± 0.2
q_{lac_growth} (pmol/cell.d)	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.3	$1.1 \pm 0.2^*$	$1.0 \pm 0.2^*$	$0.02 \pm 0.01^{**}$
$q_{lac_production}$ (pmol/cell.d)	$0.8 \pm 0.2^{**}$	0.4 ± 0.06	0.09 ± 0.01	$-0.03 \pm 0.006^{**}$	$-0.05 \pm 0.01^{**}$
IVCC (10^6 cell.d/mL)	139 ± 10.5	138 ± 26.7	134 ± 25.6	130 ± 14.7	103 ± 18.1
q_p (pg/cells.d)	6.2 ± 0.6	8.9 ± 2.0	8.2 ± 2.1	9.1 ± 1.3	9.5 ± 1.9

4.5.3 Scale-up to 2L bioreactor

A fed-batch culture was performed in a bench scale 2L bioreactor using the same production protocol and an intermediate cell density at induction of 4×10^6 cells/mL. This timing of induction was chosen to avoid the conditions with reduced productivity observed in small-scale experiments induced at either low (1×10^6 cells/mL) or high cell densities (10×10^6 cell/mL). Nutrient feeding was initiated on day 1 and repeated daily until the end of the run. The growth and productivity of rituximab-producing CHO cells are presented in Figure 4.3. Starting from 0.5×10^6 cells/mL, the cell specific growth rate was 0.03 h^{-1} , which was similar to shake flask fed-batch cultures. About 72h after inoculation, cells were induced at 4×10^6 cells/mL and the maximum viable cell concentration reached 10×10^6 cells/mL. Cell viability was maintained over 80% for 15 days. In bioreactor, the final antibody titer reached 0.94 g/L on the last day of culture, which is consistent albeit slightly lower than the maximum yields achieved in shake flasks. The antibody concentration profile (Figure 4.3B) suggests that the product was still accumulating at the end of the culture, but the run was stopped when the cell viability fell below 60%. The corresponding time evolution of the cell specific productivity for the bioreactor run is also presented in Figure 4.3B. This profile shows that the cell specific productivity was relatively maintained from day 11 (9.2 pg/cell.d) to day 18 (10.4 pg/cell.d), while the cell viability dropped from 90 to 40 %. In addition, lactate was produced during the first four days and exhibited an accumulation profile until the end of the culture. Ammonia concentration increased over time, reaching 4.4 mM at the end of the culture. Overall, these results indicate that the culture in bioreactor achieved a similar performance to that of the shake flasks for the same induction and feeding conditions.

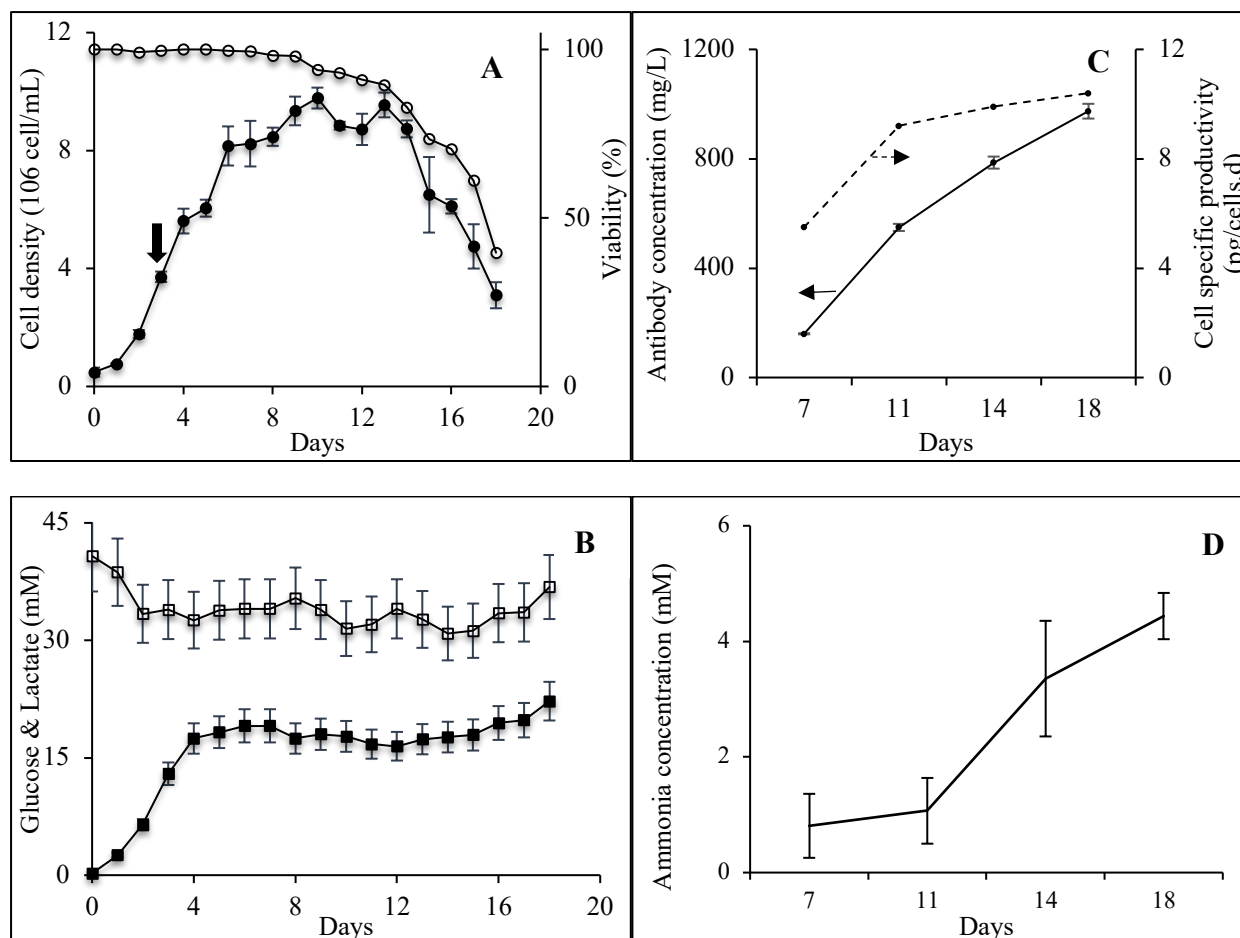


Figure 4.3: Cell viability and cell density (A), glucose and lactate concentrations (B), antibody and cell specific productivity (C) and ammonia (D) concentrations during a 2L bioreactor fed-batch culture. Empty and solid circles correspond to cell viability and viable cell concentration, respectively. Empty and solid squares to glucose and lactate concentrations, respectively. The arrow indicates the time of induction. The solid line corresponds to the antibody concentration (arrow to left-hand axis) and the dashed line to the cell specific productivity (arrow to right-hand axis). Error bars represent standard deviations of duplicate samples from the bioreactor.

4.5.4 Characterization of N-glycans distribution in shake flask and bioreactor

In the biomanufacturing of therapeutics, it is instrumental to ensure that the product presents a proper glycosylation pattern, as it will impact on both its clinical efficacy and safety. It was thus critical to assess whether the timing of induction can significantly impact the antibody glycan distribution. To this aim, HILIC analysis was performed on samples taken from cultures induced at both intermediate (4×10^6 cells/mL) and high (10×10^6 cells/mL) cell densities. For each culture condition, the first sampling point corresponded to high cell viability conditions and the second sample corresponded to the culture harvests. Samples were also collected from the bioreactor at different times post induction to evaluate the effect of culture duration on the glycosylation profile. All the samples were purified and analyzed as described in the Materials and Methods section. Figure 4.4 presents the resulting glycan distributions. The most abundant species observed were fucosylated non-galactosylated (G0F), fucosylated mono-galactosylated (G1F) and fucosylated di-galactosylated glycans (G2F). Low levels of high mannose and sialic acid fractions were also detected. G0F is a common N-glycan structure with two branches of N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue. The addition of one or two galactose residues to one or two of the G0F branches gives rise to G1F and G2F structures. Once the galactosylation has occurred, N-Acetylneuraminic acid residue can be added to either branch to form S1G1F or S2G2F structures. The HILIC results indicate that both conditions (induction at intermediate and high cell densities) presented a strikingly similar glycan distribution. For samples collected under high cell viability conditions, the percentage of galactosylation was about 70%, but this value was reduced to 66% at the end of the cultures. On the other hand, the percentage of sialylation (5%) and the percentage of fucosylation (95%) were found to be similar in all the samples.

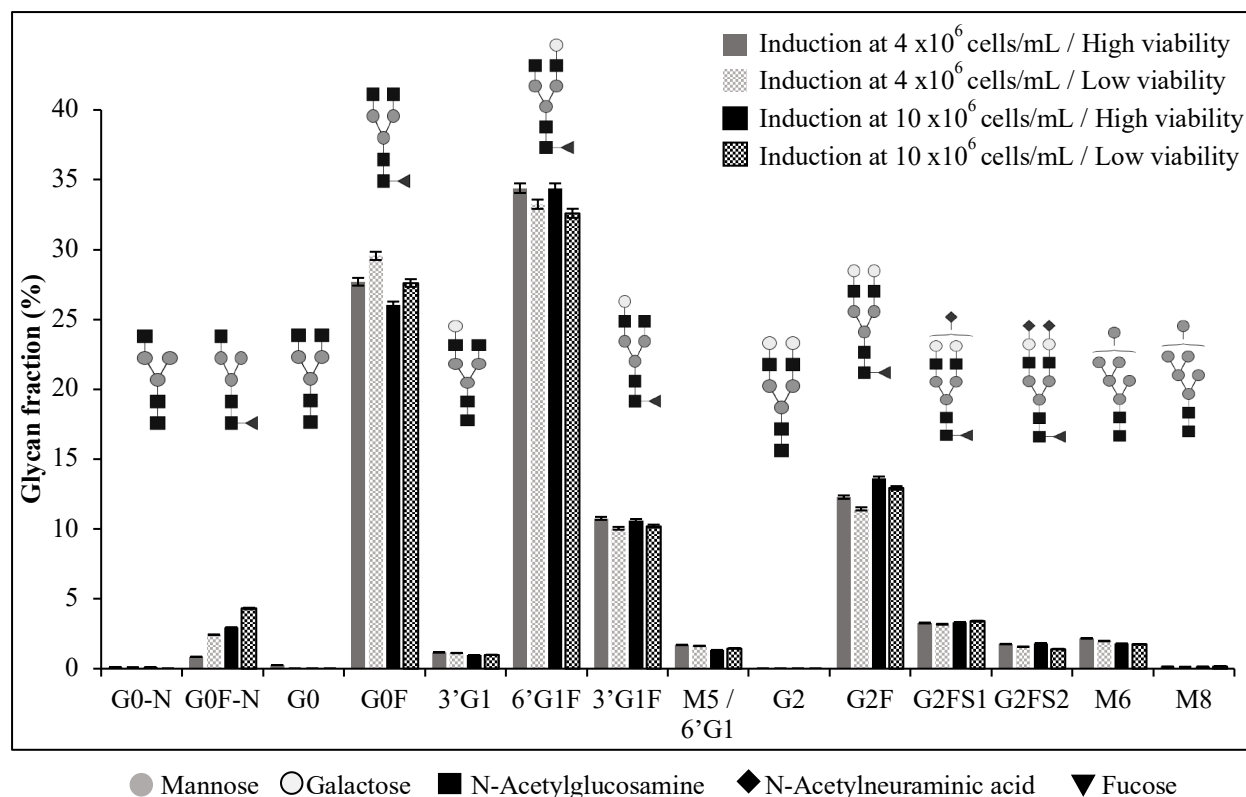


Figure 4.4 : Glycan distribution profile in shake flask fed-batch cultures. Samples from the culture induced at 4×10^6 cells/mL were taken at 9 dpi and 11 dpi. Samples from the culture induced at 10×10^6 cells/mL were taken at 7 dpi and 9 dpi. In both cases, the first sampling point corresponded to high cell viability conditions and the second sample corresponded to the culture harvest. Error bars depict standard deviations of duplicate injections.

In Figure 4.5, the glycan profiles corresponding to different sampling times from the bioreactor culture are presented. Extended culture duration is generally desirable in fed-batch processes to increase the final product titer. However, it may have a conflicting effect on product glycosylation. In fact, we can observe that the agalactosylated fraction increases over time, at the expense of both the mono- and fully-galactosylated glycans. Over the course of the culture, the percentage of galactosylation was reduced from 79 to 63%. Product fucosylation and sialylation on the other hand remained largely unchanged. Table 4.4 compares the galactosylation (GI) and sialylation (SI) indexes that were obtained for the shake flask and bioreactor cultures.

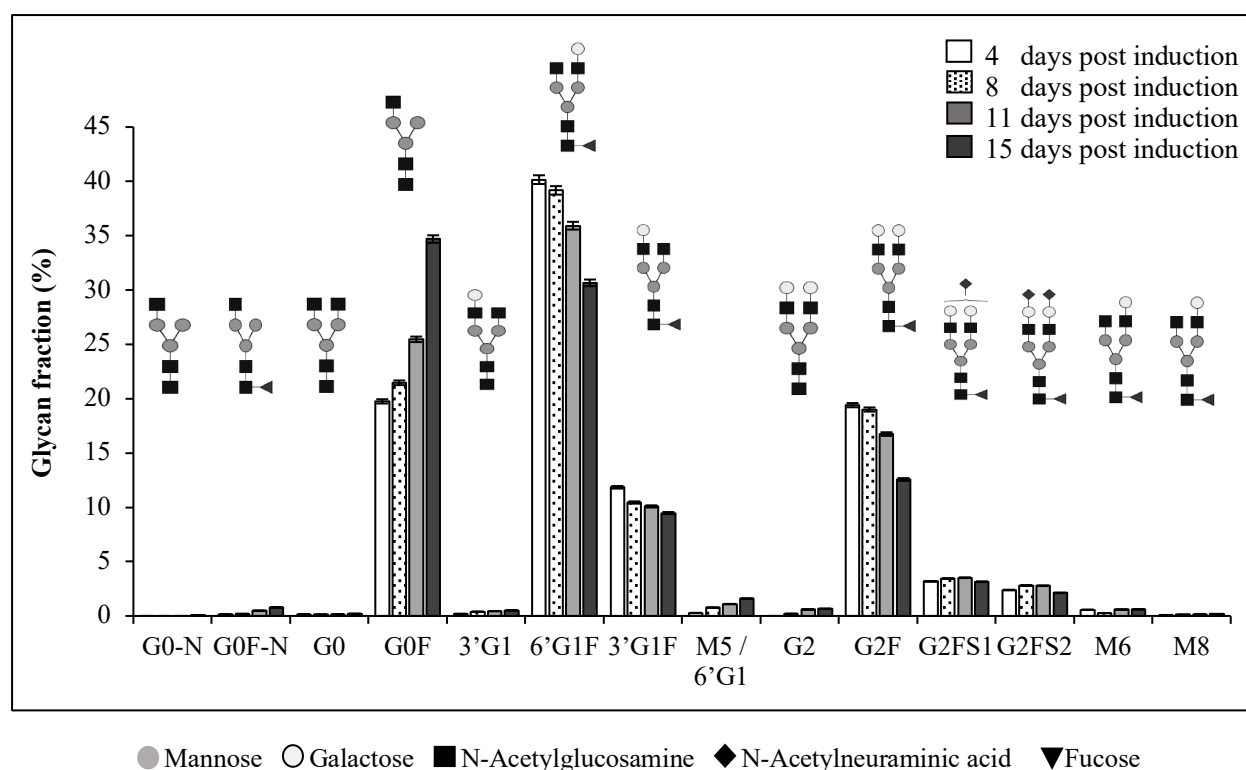


Figure 4.5 : Evolution of the glycan distribution profile during a fed-batch bioreactor culture. Error bars depict standard deviations of duplicate injections.

The galactosylation index (GI) was higher in bioreactor for the early stage of the production phase, but the value at the end of the run was comparable to the ones obtained in shake flasks. The galactosylation index (GI) was higher in bioreactor for the early stage of the production phase, but the value at the end of the run was statistically comparable ($P > 0.05$) to the ones obtained in shake flasks. In the bioreactor culture, the reduction of the galactosylation index over time was well correlated with the decrease in cell viability (Figure 4.6).

Table 4.4 : Galactosylation and sialylation indexes (dpi: days post induction). Errors were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections

	Shake-flask cultures				Bioreactor culture			
	4x10 ⁶ cells/mL		10x10 ⁶ cells/mL		4 dpi	8 dpi	11 dpi	15 dpi
	High viability	Low viability	High viability	Low viability				
GI	0.44±0.03	0.42±0.03	0.45±0.03	0.43±0.03	0.53±0.03	0.52±0.03	0.49±0.03	0.41±0.03
SI	0.04±0.03	0.03±0.03	0.04±0.03	0.03±0.03	0.04±0.02	0.04±0.02	0.05±0.02	0.03±0.02

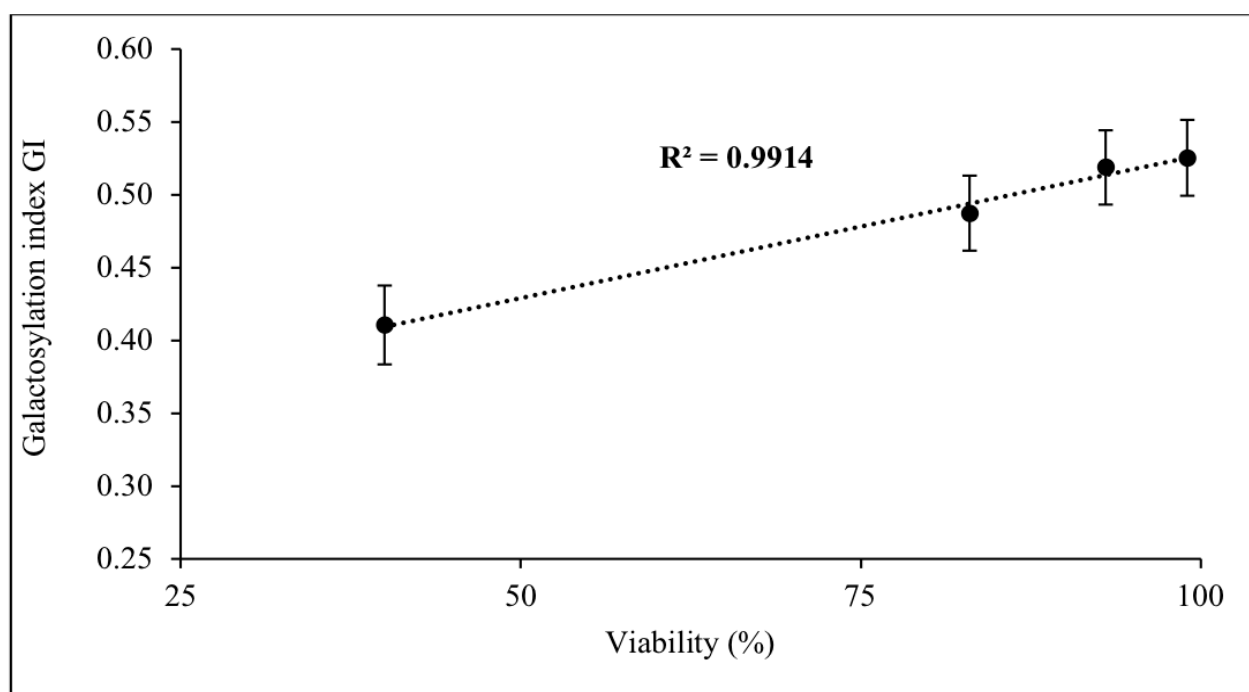


Figure 4.6 : Galactosylation index as a function of cell viability during the bioreactor run. Error bars were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections.

4.6 Discussion

Depending on the application, various expression systems have been developed where transgene expression can be regulated. As with any other inducible expression system, the interest of the cumate gene switch (Mullick et al., 2006) lies in the ability to control the onset of the production of the protein of interest. As a result, it can provide additional flexibility to culture operation by decoupling the growth and the production phases. Protein synthesis consumes a significant amount of cellular energy (at least 3ATP for each peptide bond); for a high producer IgG cell line, the recombinant product can represent 20% of the total cellular proteins (Seth, Hossler, Yee, & Hu, 2006). Thus, a significant amount of the host cell's resources is utilized for the expression of the recombinant product. This suggests some form of competitive relationship between cellular growth and productivity and indeed many studies have reported an inverse correlation between the cell specific growth rate and the cell specific productivity (Sunley & Butler, 2010; J. Zhang, 2010; Yuanxing Zhang, 2009). Hence, the potential to control the onset of antibody production is advantageous for minimizing the metabolic burden imposed on the cells. The general approach for an inducible system should thus consist in allowing the cells to grow rapidly to a desired density, then maintain a prolonged production phase by slowing/halting cell growth to favor the expression of the recombinant product. Given that the culture environment is changing over the course of a batch/fed-batch process (e.g. nutrient availability, waste metabolite accumulation), the timing of induction becomes a critical factor to establish in order to ensure an overall good culture productivity. The final antibody concentration is determined by both the cell specific production rate and the integral of viable cell concentration. In a previous study aimed at comparing the metabolism pre- and post-induction, we have shown that increasing the cell density at induction can lead to decreased cell specific production rates when cells are grown in batch cultures (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a), due the reduced availability of nutrients and the accumulation of

waste metabolites. Such reduction in specific productivity can essentially negate the expected benefits of conducting induction at high cell densities to achieve greater product yields. The aim of the present study was thus to assess the potential of using a fed-batch mode to alleviate this limitation and also investigate how the timing of induction can impact culture performance with this mode of operation.

Our results show that changing the culture mode had a significant impact on the cell kinetics and the resulting final antibody titers were increased by 3-fold in fed-batch compared to batch operation. The fed-batch led to an increase in cell specific productivity and an augmentation of the integral of viable cell. Indeed, feeding concentrated nutrients solution allowed to increase the peak cell density to 15×10^6 cells/mL (1.5-fold improvement over batch cultures) and culture duration was extended approximately from 10 to 20 days. Nutrient levels can play an important role in culture performance. Several studies have highlighted the beneficial effects of feeding glucose, glutamine and other nutrients to improve recombinant protein titers (Bibila & Robinson, 1995; Gorfien, Paul, Judd, Tescione, & Jayme, 2003; Khattak et al., 2010). The CHO cells employed in this study use the glutamine synthetase (GS) system and can grow in a glutamine-free medium. Glucose was thus the major carbon and energy source in the cultures. In our fed-batch cultures, the dynamic feeding strategy consisted in maintaining a relatively constant glucose level by daily supplementation of a concentrated feed solution. The greater availability of nutrients was undoubtedly the major factor responsible for the improvement achieved in terms of product titers compared to batch cultures. The final concentration of waste metabolites also increased in fed-batch as a result of the higher nutrient uptake rates and the prolonged culture duration. Whereas a systematic shift to lactate consumption occurred in batch cultures after 4-5 days, the shift was less pronounced in fed-batch cultures and was followed by a net production of lactate towards the end of the cultures. Ammonia is the other major by-product of animal cell cultures and a well-known

inhibitor of cell growth and productivity (Ha & Lee, 2014; Kishishita et al., 2015). With the use of a glutamine synthetase CHO cell line, ammonia accumulation is reduced upon its conversion to glutamine (Michael Butler, 2005). Nonetheless, some ammonia is still generated from the metabolic decomposition of other amino acids (Soo Min Noh, Park, Lim, Kim, & Lee, 2017). The accumulation of ammonia in fed-batch cultures was more important than during batch (5 vs 2 mM). By comparing the performance of fed-batch cultures induced at different stages of the growth phase, we observed that the timing of induction can have a significant impact on the volumetric yield. Whereas similar yields were achieved when cultures were induced at cell densities ranging from 2 to 6×10^6 cells/ml, a reduction was noted when induction was performed at either low or high cell densities. In the former case, significant growth following the induction was observed, but the overall cell specific productivity was decreased. In contrast, when the induction was performed at a cell density of 10×10^6 cells/mL, the cell specific productivity was maintained but we observed an early reduction in cell viability post-induction and an overall decrease in volumetric productivity. It should be pointed out that cell viability was still very high at the time of induction and the cells were still growing exponentially. Besides the higher cell density, the most distinctive characteristic compared to all the other fed-batch cultures was the fact that recombinant protein expression was triggered when the cells had already transitioned to lactate consumption and were thus in a different physiological state. The cell specific glucose uptake rate evaluated before induction was also found to decrease with increasing cell densities, even though its concentrations remained constant and high (30 mM) in the extracellular culture environment. For non-inducible CHO cell lines, the switch from lactate production to consumption during the production phase is a desired trait associated with improved specific productivities (Le et al., 2012; Templeton et al., 2013). In the context of the present study, the lactate metabolism switch could be used as an indicator that the cells have transitioned to a less favorable state for conducting a productive

induction. The metabolic switch from lactate production to consumption occurred around day 4-6, irrespective of when the induction was performed. The underlying physiological mechanisms leading to the lactate switch remain poorly understood, but are presumably related to the cellular redox state (Fiona, Tracy, Vicky, & Karl, 2018). Our results suggest that, when the cultures were induced after the shift in lactate metabolism (i.e. at later time points during the culture), there may have been a reduced availability of key nutrient(s) negatively impacting the overall culture productivity. Such behavior was also observed in batch with another non-GS inducible CHO clone grown in a different medium formulation (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). The latter study revealed that a number of key intracellular fluxes are affected when the cultures are induced at a high cell density after the lactate shift.

Biphasic process strategies based on a temperature shift are commonly employed. In our study, the temperature shift was performed at the time of induction, immediately following the addition of the inducing agent (cumate). For cell culture processes with CHO cells, mild hypothermia conditions in the range of 31 °C to 34 °C are typically used during the production phase (Mason, Sweeney, Cain, Stephens, & Sharfstein, 2014). In many cases, the reduction in temperature was associated with increased mRNA levels and growth cessation leading to enhancements in cell specific productivity and culture longevity (Ducommun, Ruffieux, Kadouri, Von Stockar, & Marison, 2002; Fogolín, Wagner, Etcheverrigaray, & Kratje, 2004; Fox, Patel, Yap, & Wang, 2004; Ramirez & Mutharasan, 1990), but the effects are strongly cell line and product dependent (Yoon, Song, & Lee, 2003). The use of a temperature shift was also shown to be beneficial for maintaining glycoform quality in CHO cultures (Yoon, Song, et al., 2003). In the present study, the use of mild-hypothermia conditions was always accompanied by a minor reduction in the cell specific growth rate, but significant post-induction growth was nonetheless observed in fed-batch cultures induced early and, as a result, all induction conditions reached

similar peak cell densities in the range of $12\text{-}14 \times 10^6$ cells/mL after 7 days. It remains to be evaluated if further reducing the temperature to cause growth cessation could yield culture performance improvements in the case of high cell density induction.

Nowadays, the biopharmaceutical industry is putting a great emphasis in maintaining the product quality attributes. Among them glycosylation profile is arguable one of the most important since it will determine the effectiveness of the antibody *in vivo*, including antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC and complement dependent cytotoxicity CDC (Abès & Teillaud, 2010). In cell culture processes, several factors are known to impact the glycosylation pattern of the recombinant product, including the host cell line, the medium composition and process operating conditions such as temperature, pH and DO (Nam, Zhang, Ermonval, Linhardt, & Sharfstein, 2008). The impact of waste metabolite accumulation and glucose limitation have also been extensively demonstrated (Villacrés et al., 2015).

In fed-batch cultures, we have shown that the timing of induction can impact the product yield if the expression is triggered when the cell density is too high or too low, but it had surprisingly little effect on the final glycan distribution, as evident from the HILIC analysis corresponding to the cultures induced at 4 and 10×10^6 cells/mL. However, we observed a notable reduction over time of the mono- and di-galactosylated (G1 and G2) fractions in favor of the G0 form during the fed-batch bioreactor culture. This reduction was concomitant with an increase in ammonia and a decrease in cell viability over time. By-product accumulation in the culture media can impact cell viability (C Altamirano et al., 2000; Claudia Altamirano et al., 2004; Yuzhou Fan et al., 2015; Genzel, Ritter, König, Alt, & Reichl, 2005; Yang & Butler, 2002) and thus indirectly alter the glycosylation profile via the release of proteases and glycosidases upon cell lysis (M Butler, 2006; Ana Rita Costa, Rodrigues, Henriques, Oliveira, & Azeredo, 2014). Elevated levels of ammonia (>10 mM) were also shown to alter the glycosylation pattern (P. Chen & S. W.

Harcum, 2006; M. Gawlitzek, T. Ryll, J. Lofgren, & M. B. Sliwkowski, 2000; Yang & Butler, 2002), most likely via a modification of the intracellular pH impacting galactosyltransferase activity (McCracken, Kowle, & Ouyang, 2014). While the final ammonia concentrations in fed-batch cultures were 2-fold greater than in batch, they remained below 5 mM in all the conditions. Some studies have reported the negative effect of ammonia accumulation on the inhibition of certain glycosylation enzymes and precursor even at relatively low concentrations (D. C. Andersen & Goochee, 1995; Ha & Lee, 2014). While extended culture longevity is generally sought after for maximizing product yield, it may also have a detrimental impact on the quality of the product. This emphasizes the importance to balance between product titer and quality in the establishment of a suitable harvest time (Y. Fan et al., 2015).

A previous study conducted by Sheikholeslami *et al.* with a different inducible CHO cell clone (non-GS) expressing the same product and harboring the same cumate gene switch also demonstrated that the timing of induction (the cell density at induction) is a critical factor impacting cell growth and productivity (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). It was also shown that post-induction glutamine feeding can greatly influence the integral of viable cell density and the final volumetric productivity (Z. Sheikholeslami, Jolicoeur, & Henry, 2014). These observations are consistent with the results from the present study, even though we employed a higher producer clone and a different culture medium. It would be important to assess how our findings would apply in the case of a different recombinant product or with another inducible system, but our study emphasizes that the cell density at induction can be a critical parameter to optimize when conducting fed-batch process development with inducible systems.

4.7 Conclusion

For a biphasic process employing an inducible expression system, the cell culture state at the time of induction is a key determinant of the culture performance. Our study demonstrated that a dynamic fed-batch strategy can significantly increase antibody production compared to batch, mainly via an increase in the integral of viable cell concentration. While a high antibody titer can be achieved under most induction conditions, inducing cultures when the cell density is too high or too low leads to a decrease in the volumetric productivity. We have also shown that the timing of induction bears no significant impact on the glycosylation pattern if the cultures are harvested at similar cell viabilities, but the degree of galactosylation of the antibody was found to decrease with culture duration. Further process improvements could likely be achieved by defining specific operational parameters and feeding regimes for the growth and production phases.

4.8 Acknowledgements

We would like to thank Mr.Denis Brochu and Mr.Michel Gilbert from the Human Health Therapeutics Research Center at National Research Council Canada (Ottawa) for performing the HILIC analysis. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). This is NRC publication #NRC_HHTXXX.

4.9 Supplementary figures

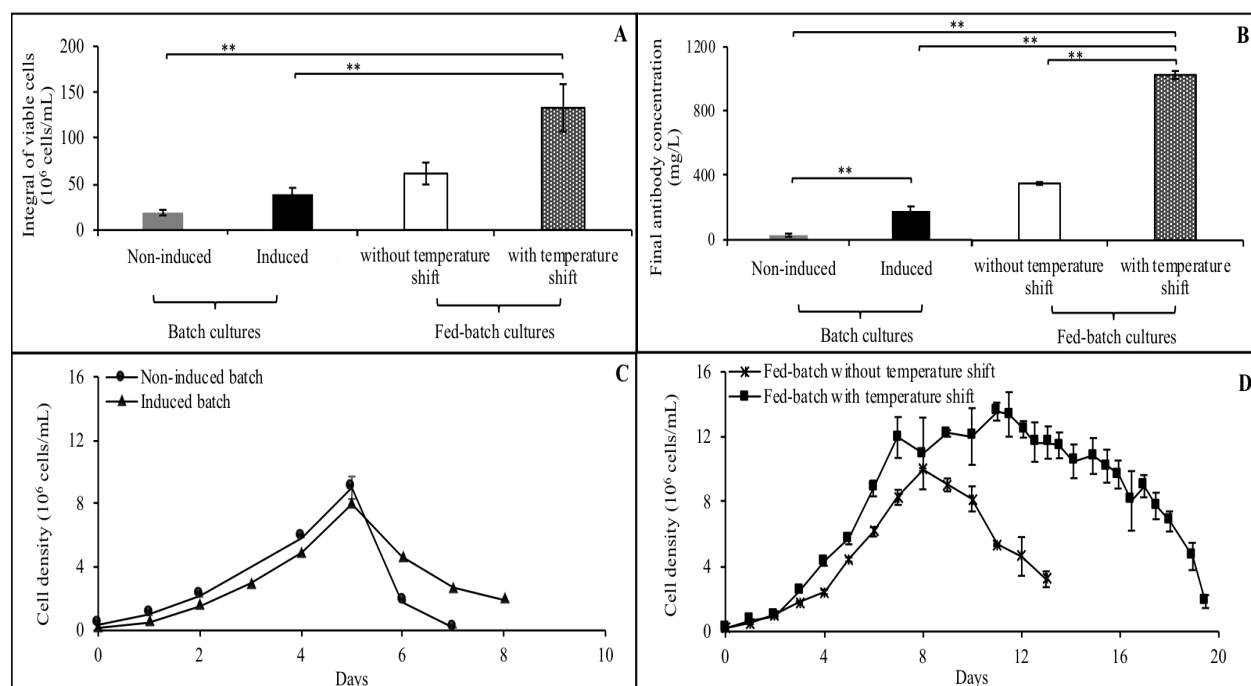


Figure 4.S1 : Comparison of cell growth (A) and antibody production (B) in induced and non-induced (control) batch cultures, and in fed-batch cultures with or without (control) a temperature switch to mild-hypothermia conditions at induction (34 °C). The corresponding cell density profiles are shown for the batch (C) and fed-batch cultures (D). Error bars indicate standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $**p < 0.005$.

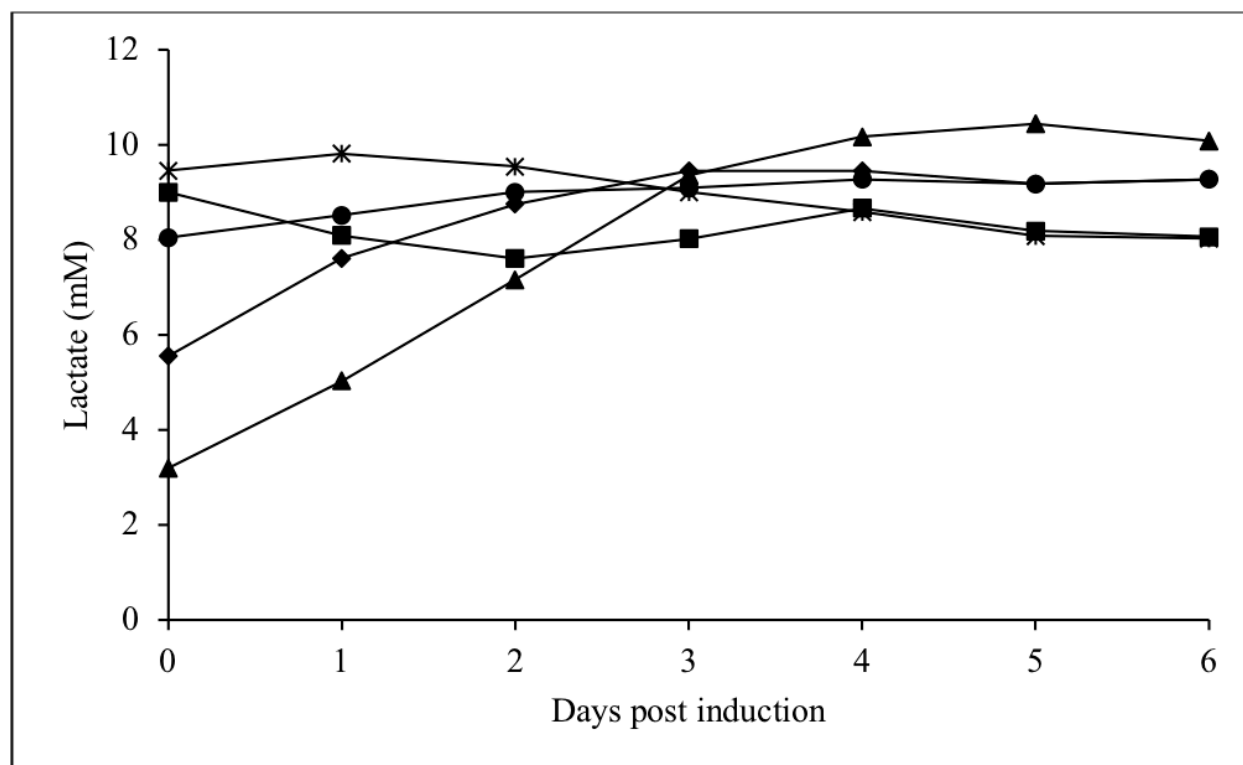


Figure 4.S2 : Lactate concentration profiles post-induction in fed-batch cultures. Cultures were induced at 1×10^6 cells/mL (triangle), 2×10^6 cells/mL (circle), 4×10^6 cells/mL (diamond), 6×10^6 cells/mL (cross) and 10×10^6 cells/mL (square).

4.10 References

- Abès, R., & Teillaud, J.-L. (2010). Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals*, 3(1), 146-157.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology progress*, 16(1), 69-75.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Andersen, D. C., & Goochee, C. F. (1995). The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 47(1), 96-105.
- Bibila, T. A., & Robinson, D. K. (1995). In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production. *Biotechnology progress*, 11(1), 1-13.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(3), 283-291.
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1-3), 57.
- Cacciatore, J. J., Chasin, L. A., & Leonard, E. F. (2010). Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology advances*, 28(6), 673-681.
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab Eng*, 8(2), 123-132. doi:10.1016/j.ymben.2005.10.002
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical reviews in biotechnology*, 34(4), 281-299.
- Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L.-E., Timmins, N. E., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2012). A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. *PloS one*, 7(8), e43394.
- Dorion-Thibaudau, J., Raymond, C., Lattová, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *Journal of immunological methods*, 408, 24-34.
- Dorion-Thibaudau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fcγ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *Journal of Molecular Recognition*, 29(2), 60-69.
- Ducommun, P., Ruffieux, P. A., Kadouri, A., Von Stockar, U., & Marison, I. (2002). Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnology and bioengineering*, 77(7), 838-842.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Lund, A. M., Sen, J. W., Rasmussen, S. K., . . . Andersen, M. R. (2015). A multi-pronged investigation into the effect of glucose starvation and culture duration on fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 112(10), 2172-2184. doi:10.1002/bit.25620
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., . . . Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture

- affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 521-535.
- Fiona, H., Tracy, W., Vicky, C., & Karl, M. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 0(0). doi:doi:10.1002/bit.26603
- Fogolin, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of biotechnology*, 109(1), 179-191.
- Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G., & Wang, D. I. (2004). Maximizing interferon- γ production by chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. *Biotechnology and bioengineering*, 85(2), 177-184.
- Gawlitczek, M., Ryll, T., Lofgren, J., & Sliwowski, M. B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng*, 68(6), 637-646.
- Genzel, Y., Ritter, J. B., König, S., Alt, R., & Reichl, U. (2005). Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology progress*, 21(1), 58-69.
- Gorfien, S. F., Paul, W., Judd, D., Tescione, L., & Jayme, D. W. (2003). Optimized nutrient additives for fed-batch cultures. *Biopharm international*, 16, 34-41.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547-5551.
- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of biotechnology*, 180, 23-29.
- Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology progress*, 26(5), 1400-1410.
- Khattak, S. F., Xing, Z., Kenty, B., Koyrakh, I., & Li, Z. J. (2010). Feed development for fed-batch CHO production process by semisteady state analysis. *Biotechnology progress*, 26(3), 797-804.
- Kim, H., & Lee, G. M. (2007). Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(5), 712-720.
- Kim, N. S., & Lee, G. M. (2000). Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 71(3), 184-193.
- Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., . . . Aoyagi, H. (2015). Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(1), 78-84.
- Lam, C., Santell, L., Wilson, B., Yim, M., Louie, S., Tang, D., . . . Snedecor, B. (2017). Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt-and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells. *Biotechnology progress*, 33(2), 523-533.
- Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., . . . Hu, W.-S. (2012). Multivariate analysis of cell culture bioprocess data—lactate consumption as process indicator. *Journal of biotechnology*, 162(2), 210-223.

- Lee, F. W., Elias, C. B., Todd, P., & Kompala, D. S. (1998). Engineering Chinese hamster ovary (CHO) cells to achieve an inverse growth-associated production of a foreign protein, β -galactosidase. *Cytotechnology*, 28(1-3), 73-80.
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. Paper presented at the MAbs.
- Lipscomb, M. L., Mowry, M. C., & Kompala, D. S. (2004). Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor. *Biotechnology progress*, 20(5), 1402-1407.
- Liu, C.-H., Chu, I.-M., & Hwang, S.-M. (2001). Enhanced expression of various exogenous genes in recombinant Chinese hamster ovary cells in presence of dimethyl sulfoxide. *Biotechnology letters*, 23(20), 1641-1645.
- Lu, F., Toh, P. C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, J. (2013). Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1), 191-205.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., & Sharfstein, S. T. (2014). Reduced culture temperature differentially affects expression and biophysical properties of monoclonal antibody variants. *Antibodies*, 3(3), 253-271.
- McCracken, N. A., Kowle, R., & Ouyang, A. (2014). Control of galactosylated glycoforms distribution in cell culture system. *Biotechnol Prog*, 30(3), 547-553. doi:10.1002/btpr.1906
- Misaghi, S., Chang, J., & Snedecor, B. (2014). It's time to regulate: Coping with product-induced nongenetic clonal instability in CHO cell lines via regulated protein expression. *Biotechnology progress*, 30(6), 1432-1440.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., . . . Lo, R. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC biotechnology*, 6(1), 43.
- Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., & Hu, W. S. (2016). Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends Biotechnol*, 34(8), 638-651. doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.012
- Nam, J. H., Zhang, F., Ermonval, M., Linhardt, R. J., & Sharfstein, S. T. (2008). The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1178-1192.
- No, D., Yao, T.-P., & Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3346-3351.
- Noh, S. M., Park, J. H., Lim, M. S., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2017). Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(3), 1035-1045.
- Poulain, A., Perret, S., Malenfant, F., Mullick, A., Massie, B., & Durocher, Y. (2017). Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *Journal of biotechnology*.
- Ramirez, O. T., & Mutharasan, R. (1990). Cell cycle-and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 36(8), 839-848.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangues, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial cell factories*, 15(1), 1.

- Sauer, P. W., Burky, J. E., Wesson, M. C., Sternard, H. D., & Qu, L. (2000). A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and bioengineering*, 67(5), 585-597.
- Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C., & Hu, W.-S. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing—physiological fundamentals *Cell Culture Engineering* (pp. 119-164): Springer.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013). The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 162-171. doi:10.1016/j.bej.2013.07.015
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2014). Elucidating the effects of postinduction glutamine feeding on the growth and productivity of CHO cells. *Biotechnology Progress*, 30(3), 535-546. doi:10.1002/btpr.1907
- Sunley, K., & Butler, M. (2010). Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology advances*, 28(3), 385-394.
- Takahashi, K., Tereda, S., Ueda, H., Makishima, F., & Suzuki, E. (1994). Growth rate suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity. *Cytotechnology*, 15(1-3), 57-64.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7).
- Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology journal*, 10(7), 1051-1066.
- Xu, S., Jiang, R., Mueller, R., Hoesli, N., Kretz, T., Bowers, J., & Chen, H. (2018). Probing lactate metabolism variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology Progress*, 34(3), 756-766. doi:doi:10.1002/btpr.2620
- Yang, M., & Butler, M. (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology progress*, 18(1), 129-138.
- Yoon, S. K., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(3), 289-298.
- Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 1108-1115.
- Zhang, J. (2010). Mammalian cell culture for biopharmaceutical production *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Third Edition* (pp. 157-178): American Society of Microbiology.
- Zhang, L., Shen, H., & Zhang, Y. (2004). Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(2), 171-181.
- Zhang, Y. (2009). Approaches to optimizing animal cell culture process: substrate metabolism regulation and protein expression improvement *Biotechnology in China I* (pp. 177-215): Springer.
- Zhou, W., Chen, C. C., Buckland, B., & Aunins, J. (1997). Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 55(5), 783-792.
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, 30(5), 1158-1170.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : ASSESSMENT OF FED-BATCH CULTIVATION STRATEGIES FOR AN INDUCIBLE CHO CELL LINE

5.1 Présentation de l'article

Ce chapitre reprend l'article de recherche intitulé '*Assessment of Fed-batch Cultivation Strategies for an Inducible CHO Cell Line*' soumis pour publication dans *Journal of Biotechnology*

Le travail précédent a permis de mettre en évidence l'importance de la densité cellulaire à l'induction ainsi que l'intérêt que présente le mode cuvée-alimentée pour le système inductible. Cette seconde étude présente une comparaison de différentes stratégies d'alimentation et conditions de culture visant à améliorer la performance en mode cuvée-alimentée. Nous montrons en premier lieu qu'alimenter les cultures dès le début de la phase de croissance s'avère bénéfique en termes de croissance cellulaire et de production d'anticorps. Par la suite, il est démontré que le taux d'alimentation doit être bien balancé, puisqu'une supplémentation trop élevée ou trop basse entraîne une baisse significative de la production en anticorps. Nous avons également étudié l'impact d'utiliser différentes températures lors des phases de croissance et de production. Les meilleurs rendements sont obtenus lorsque la température est baissée de 37 à 30 °C au moment de l'induction et jusqu'à la fin de la phase de production. Enfin, il est aussi démontré que le pourcentage de galactosylation du produit est plus important lorsque la phase de croissance est conduite à température physiologique plutôt qu'à 34 °C.

Kahina Mellahi^a, Denis Brochu^b, Michel Gilbert^b, Michel Perrier^a, Sven Ansorge^c, Yves Durocher^c, and Olivier Henry^{a*}

^a Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

^b Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Ottawa, Canada

^c Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address : olivier.henry@polymtl.ca

5.2 Abstract

In order to maximize cell growth and productivity for an inducible CHO cell line expressing rituximab, various fed-batch culture strategies were investigated. In each case, the performance was evaluated for cultures induced at moderate and high cell density conditions (4×10^6 and 10×10^6 cells/mL) to assess the impact of the timing of induction. We first demonstrate the importance of starting the feeding process during the growth phase, as this translated into significantly improved integral of viable cells and antibody titers, when compared to post-induction feeding only. Secondly, we investigated the impact of the feed rate by maintaining different levels of glucose (25, 35 and 50 mM) via a dynamic feeding strategy. The highest antibody titers were achieved under a moderate feeding regime for both cell densities at induction, highlighting the risks of under- or over-feeding the cultures. We then evaluated the impact of performing a temperature shift at induction by testing different mild hypothermia conditions. At small-scale, the highest production yields (1.2 g/L) were achieved when the temperature was reduced from 37 to 30 °C during the production phase of a culture induced at high cell density. When the strategy was applied in bioreactor, the better controlled conditions led to even greater product titers (1.8 g/L). Furthermore,

this production protocol was shown to promote a more galactosylated glycan profile than a bioreactor culture initiated at 34°C during growth and downshifted to 30°C during the production phase.

Key words: fed-batch culture, biphasic process, inducible CHO cells, antibody production, glycan distribution.

5.3 Introduction

Over the past decades, considerable efforts in the field of animal cell technology have been dedicated to increase recombinant protein yields and ensure high product consistency. The development of efficient expression systems as well as the optimization of cell culture processes have led to product titers now routinely in excess of 5 g/L (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011; Demain & Vaishnav, 2009; Hansen et al., 2017; Y. M. Huang et al., 2010). It is estimated that mammalian cell-produced therapeutic proteins represent approximately 20% of the pharmaceutical market (Richelle & Lewis, 2017). In view of the increasing demand for biopharmaceuticals, including antibodies, improving the production efficiency is critical and a well-optimized expression system is one of the key elements that can enhance the level of recombinant protein production.

In recent years, the use of inducible mammalian expression systems has been increasingly reported for the production of several recombinant proteins in CHO cells (Gaillet et al., 2007; Gaillet et al., 2010; Z. Li, Michael, Zhou, Nagy, & Rini, 2013; Misaghi et al., 2014). Inducible systems are generally considered ideal for expressing cytotoxic products, but also conveniently allow to separate the growth and the production phases, which can then be optimized independently (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). Among the different inducible mammalian expression systems available, the cumate gene switch system has gained increased interest (Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017; Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). However, process conditions and culture operating strategies resulting in enhanced yields and product quality have not yet been documented for this system, as well as for other commonly employed inducible mammalian expression systems.

Fed-batch remains the most widely used culture operating mode, as it combines both operational simplicity and higher product yields when compared to batch and perfusion processes (Gong et al., 2006; Ochoa, 2016), especially at industrial scale. The fundamental principle behind fed-batch cultures consists on periodic or continuous supplementation of a concentrated feed solution to avoid nutrient limitations. The amount of nutrients to be added depends on the nutrient consumption rates which, in turn, is a function of cell density, growth and metabolism (Yuanxing Zhang, 2009). Due to the complexity of the metabolism of animal cells and to the still limited knowledge about the factors regulating product synthesis and secretion, the establishment of a culture feeding strategy remains largely empirically-based (Claudia Altamirano et al., 2004; T. A. B. a. D. K. Robinson, 1995; Xie & Wang, 1994b). The feeding regime directly affects the process cultivation in terms of growth, product formation and by-product generation (Mears, Stocks, Sin, & Gernaey, 2017). An effective feeding strategy should not only avoid nutrient limitations, but also minimize the accumulation of metabolic by-products (Gong et al., 2006). Numerous feeding solutions and strategies have been proposed as reviewed in Xie *et al.* and Wlaschin *et al.* (Sun et al., 2013; Wlaschin & Hu, 2006; Xie & Wang, 1997). The most common approaches rely on bolus additions of a concentrated feed solution. While operationally simple, such strategy leads to variations in nutrient concentration and a potential undesired sudden increase in osmolality (Vallée et al., 2014). On the other hand, more controlled dynamic feeding strategies were developed in an effort to meet the evolving cell demand during a fed-batch culture. Some dynamic feeding strategies are focused on the reduction of by-product accumulation by maintaining the main nutrient at low levels (Chee Fung Wong et al., 2005; Kuwae, Ohda, Tamashima, Miki, & Kobayashi, 2005; Sauer et al., 2000; Zhou, Rehm, et al., 1997) and control of nutrient feed rate (Claudia Altamirano et al., 2006; C Altamirano et al., 2000; Claudia Altamirano et al., 2004; Cruz et al., 2000; De Tremblay, Perrier, Chavarie, & Archambault, 1993; Gowtham, Saski, & Harcum, 2017; Kurokawa et al., 1994; S. Lu et al., 2005; Sauer et al., 2000; Siegwart et al., 1999). However, the successful implementation of such strategies requires frequent sampling and reliable measurement tools for the feedback control loop (F. Lu et al., 2013). Other feeding strategies are based on the measurement of oxygen uptake rate (Aehle et al., 2011), on the online measurement of the biomass (F. Lu et al., 2013) or by following the pH value along the culture to determine the amount of nutrients added to the culture (M. Gagnon et al., 2011).

Environmental physico-chemical parameters such as pH, dissolved oxygen (DO) and temperature can also have a significant effect on cell growth, metabolism and protein synthesis (Kou, Fan,

Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011). Temperature is an important process parameter that has been thoroughly investigated in the case of CHO cells with constitutive expression. Many processes are operated as a biphasic culture, whereby cells are initially grown at physiological temperature to maximize biomass growth, then the culture is shifted to a lower temperature (28-34°C) during the production phase (Kumar, Gammell, Meleady, Henry, & Clynes, 2008; Mason et al., 2014). Low temperature cultivation is a simple and effective method of controlling cell proliferation and maintaining a high viability over a prolong period of time (S Oguchi, Saito, Tsukahara, & Tsumura, 2003; Satoshi Oguchi, Saito, Tsukahara, & Tsumura, 2006). A higher cell specific productivity is also often reported under mild hypothermia conditions (W. C. Yang, D. F. Minkler, R. Kshirsagar, T. Ryll, & Y.-M. Huang, 2016). The effect of proliferation control on protein production by CHO cells with constitutive expression have been reviewed in details (Kumar, Gammell, & Clynes, 2007).

Given the increasing interest toward mammalian inducible cell lines, there is a need to develop optimized cultivation conditions, including feeding strategies, that are specific to these systems. The goal of this study was to explore the effect of various feeding regimes and temperature shift strategies to improve antibody productivity and ensure product quality. The timing of induction is a critical parameter to consider for inducible systems to carefully balance between rapid cell growth, culture longevity and high productivity. We have previously shown that the cell kinetics can be impacted depending on the cell density at induction in batch cultures (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). For this reason, the various fed-batch strategies presented herein were evaluated and compared by considering both a moderate and a high cell density at induction.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Cell line and culture media

A glutamine synthetase CHO cell line (CHOBRI/rcTA) allowing the cumate inducible expression (Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017) of rituximab, a chimeric anti-human CD20 monoclonal antibody, was used in this study. Cells were maintained in chemically defined PowerCHO2 (Lonza, USA) medium supplemented with 50µM methionine sulfoximine (MSX) (Sigma Life Science, USA). Fed-batch cultures were performed using BalanCD growth A (Irvine Scientific, USA) as a basal medium supplemented with 50µM methionine sulfoximine (MSX) and 0.3% pluronic F68 (Sigma Aldrich, USA). Cultures were fed with a commercial chemically-defined feed formulation,

IS CHO-CD F12.7 (Irvine Scientific, USA), where glucose concentration was about 175 mM, supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) and 0.3% of kolliphor (Sigma Aldrich, USA). For fed-batch cultures, the feed rate was adjusted daily so as to maintain a prescribed constant glucose level in the cultures (F. Lu et al., 2013). For small-scale experiments, duplicate 125 mL shake flasks (Corning) were inoculated at a viable cell density of 0.2×10^6 cells/mL. These cultures were agitated by an orbital shaker in a humidified incubator maintained at a desired temperature with a 5% CO₂ overlay. Cultures were induced by adding 2 μ g/mL cumate (Sigma Aldrich, USA) and the temperature was adjusted to the desired value (37, 34 or 30 °C) during the production phase. Supplementation of 0.05 mg/mL of dextran sulfate (Sigma Life Science, USA) was done 24 h after induction. Samples were collected daily and culture supernatants were stored at -20°C for subsequent off-line analysis.

5.4.2 Bioreactor cultures

Experiments were carried out in a fully equipped 2L bioreactor (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland). Cultures were inoculated at 0.5×10^6 cells/mL and with an initial working volume of 0.5 L. pH was controlled at 7.0, dissolved oxygen was maintained at 45% of air saturation and the total gas flow rate was set at 100 mL/min. Cultures were initiated at an agitation speed of 100 rpm, but this value was increased to 120 rpm after induction to improve the oxygen transfer. The bioreactor runs were started at two different temperatures (37 °C and 34 °C) and both cultures were switched to 30 °C during the production phase. Culture induction was performed when a cell density of 10×10^6 cells/mL was reached. The same dynamic feeding strategy as in shake flasks was used to supplement the bioreactors.

5.4.3 Nutrients concentration, metabolites and product analyses

Cell concentrations and cell viabilities were assessed based on the trypan blue exclusion method using a standard light microscope. Extracellular lactate and glucose concentrations were quantified using a biochemistry analyzer YSI 2700 model (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH). An enzymatic assay kit (AA0100-IKT, Sigma-Aldrich) was used for ammonia concentration measurement. The concentration of antibody was determined by surface plasmon resonance (SPR) using a Biacore T100 instrument (GE Healthcare). HBS-P 1x at pH 7.4 was used as running buffer. Ecoil-tagged Fc γ RI (CD64) (20 μ g/mL) were immobilized on a Kcoil surface at 30 μ L/min for 20 s. The calibration curve was obtained by injecting dilutions of a purified Rituximab standard.

Supernatants were then injected at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 60 s, followed by running buffer injection at the same flow rate for 3 min. Regeneration of the surface was done by the injection of Guanidium/HCl 6 M at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 30 s. Linear regression between 5 and 55s of the Mab injection over captured CD64 receptors was used to determine the initial binding rate of antibody concentrations ranging between 0.2 and 25 nM (n=10).

5.4.4 Antibody purification and glycan analysis

Cell culture supernatants were filtered and mixed to a loading buffer solution before purification by protein A chromatography using an Akta Explorer System (GE Healthcare, Baie-d'Urfé, QC). Protein A (ESHMUNO[®], MiniChrom column, Eshmuno[®] A, 1 mL, Merck) column was equilibrated before sample injection at 1.5 mL/min. Monoclonal antibodies were eluted at the same flow rate using 20 mM Glycine pH 4 buffer. Buffer-exchange against water was performed using Amicon Ultra-4 filter device (Millipore). Samples were then stored at -20 °C for subsequent product quality analysis. Glycan distributions were determined by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC). The first step consists on the denaturation of concentrated samples by PNGase F at 37 °C during 24 h. The samples were then labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) prior to injection on a TSKgel Amide-80 column. Glycans were eluted with 100 mM ammonium formate at pH 4.5 (solvent A) and 100% acetonitrile (solvent B). The fluorescence chromatograms were calibrated against 2-AB dextran ladder and compared to GU values in glycobase.nibrt.ie/glycobase/. The relative abundance of the glycoforms was determined from the peak areas of 2-AB-labelled N-linked glycans.

5.4.5 Average cell specific rates

The average cell specific rates were calculated during the growth (from inoculation to induction) and the production (from induction to harvest) phases according to:

$$\text{Growth phase: } q_i^{\text{avg}} = \frac{(C_i)_{t_0} (V)_{t_0} - (C_i)_{t_{\text{induction}}} (V)_{t_{\text{induction}}} + \sum V_{\text{feed}} C_{i,\text{feed}}}{\int_{t_0}^{t_{\text{induction}}} X_v V dt}$$

$$\text{Production phase: } q_i^{\text{avg}} = \frac{(C_i)_{t_{\text{induction}}} (V)_{t_{\text{induction}}} - (C_i)_{t_{\text{harvest}}} (V)_{t_{\text{harvest}}} + \sum V_{\text{feed}} C_{i,\text{feed}}}{\int_{t_{\text{induction}}}^{t_{\text{harvest}}} X_v V dt}$$

Where C_i was the nutrient or metabolite concentration, V was the culture volume, V_{feed} was the volume of feed medium added, $C_{i,feed}$ was the concentration of nutrient in the feed solution, t_0 was the inoculation time, $t_{induction}$ was the time of induction and $t_{harvest}$ was the time of harvest. Similarly, the average cell specific productivity was calculated over the whole duration of the cultures as followed:

$$q_P^{avg} = \frac{(C_{mAb})_{t_0} (V)_{t_0} - (C_{mAb})_{t_{harvest}} (V)_{t_{harvest}}}{\int_{t_0}^{t_{harvest}} X_v V dt}$$

For statistical analysis, an unpaired two sided Student's t-test was used.

5.5 Results

5.5.1 Effect of feeding start time on culture performance

Parallel fed-batch cultures were first carried out in shake flasks with different feeding starting times to investigate the impact of this factor on cell growth, metabolite formation and antibody production. Three conditions were evaluated: (i) feeding started 24h after inoculation (ii) feeding started at the time of induction and (iii) feeding started 24h post-induction. All the cultures were fed until harvest and a temperature shift from 37 to 34°C was performed at the time of induction. These feeding regimes were tested for two cell densities at induction, one corresponding to the mid-exponential phase (4×10^6 cells/mL) and one corresponding to the late exponential phase (10×10^6 cells/mL) when cells are grown using the same medium formulation without induction of expression (i.e. no addition of cumate). Figure 5.1 shows the resulting viable cell concentration profiles and the corresponding cell viability profiles. For both intermediate and high cell density inductions, cell growth was significantly enhanced when the cultures were fed pre- and post-induction with the concentrated nutrient solution. The maximum viable cell concentrations reached were 13×10^6 and 14×10^6 cells/mL for the cultures induced at 4×10^6 and 10×10^6 cells/mL, respectively. Culture duration was 16 days for the fed-batch cultures induced at an intermediate cell density, with a cell viability maintained above 80% for 14 days. In contrast, cell viability experienced a decline starting on day 10 for the culture induced at 10×10^6 cells/mL. In the case of

the cultures where supplementation was started at the time or after induction, the maximum viable cell concentrations attained were reduced by 30-35 % ($\sim 9 \times 10^6$ cells/mL) and cell viability dropped earlier compared to the cultures fed pre- and post-induction. Overall, feeding the cultures early was associated with a significant enhancement of the integral of viable cell concentrations and the improvement was more pronounced for induction at an intermediate cell density (Table 5.1).

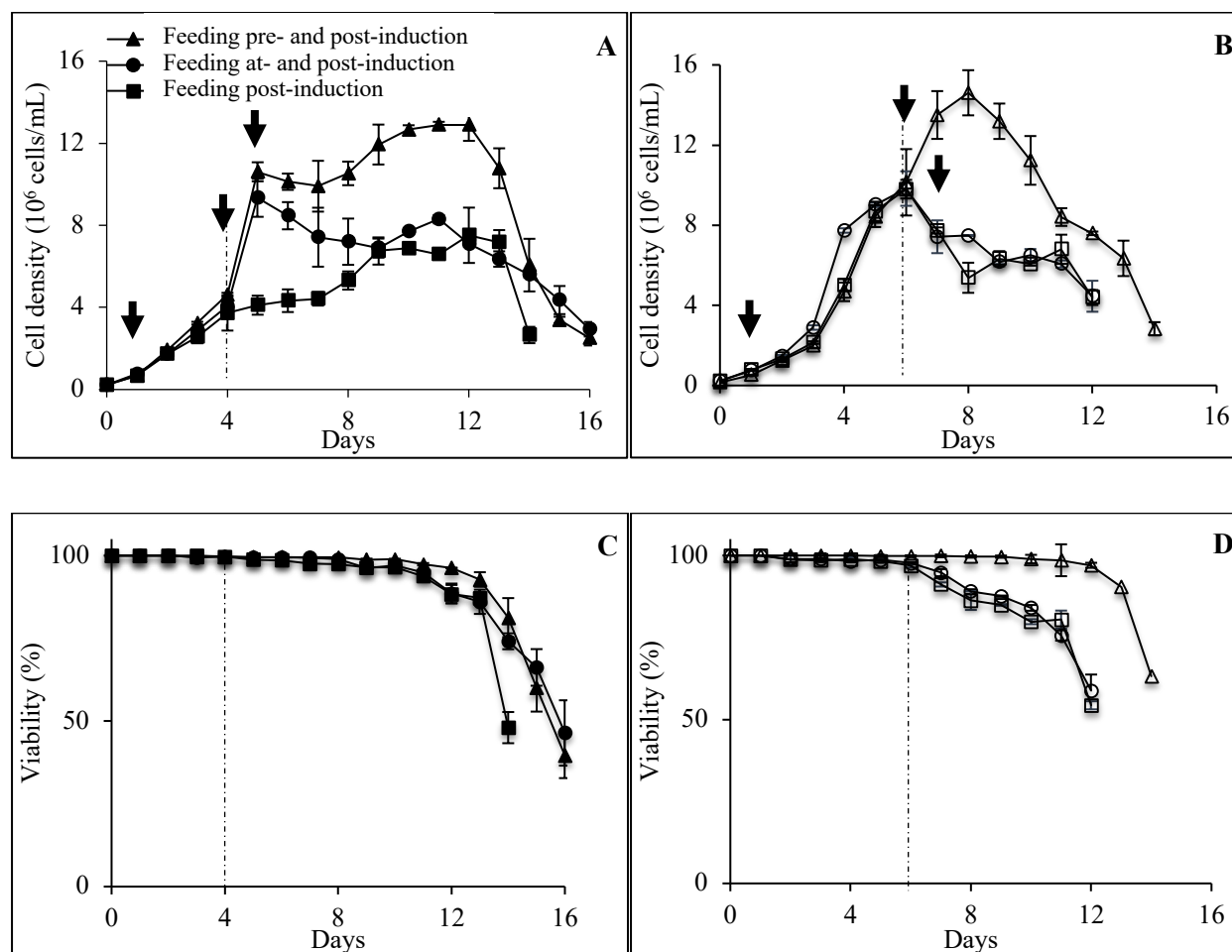


Figure 5.1 : Cell density (A & B) and cell viability (C & D) profiles for fed-batch cultures with different feeding starting times. Feeding was initiated pre-induction (triangles), at the time of induction (circles) and post-induction (squares), corresponding to 24h, 96h and 120h, respectively. Solid symbols represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. The dash lines indicate the timing of induction and the arrows indicate the onsets of feeding. The temperature was shifted from 37 °C to 34 °C at the time of induction. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.

Table 5.1 : Cell specific rates in shake flask cultures with different feeding start times and induced at 4×10^6 and 10×10^6 cells/mL. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments

Feeding start time	Induction at 4×10^6 cells/mL			Induction at 10×10^6 cells/mL		
	pre-induction	at-induction	post- induction	pre-induction	at-induction	post- induction
μ (d^{-1})	0.67 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.50 ± 0.01
IVCC (10^6 cells.d/mL)	95 ± 8	78 ± 11	58 ± 6	98 ± 13	63 ± 6	58 ± 6
q_P^{avg} (pg/cell.d)	10.5 ± 1.1	8.1 ± 1.3	9.2 ± 1.1	10.3 ± 1.4	8.3 ± 0.9	8.1 ± 1.0
$q_{NH_3}^{avg}$ (pmol/cell.d)	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01
<i>Metabolic rates pre-induction</i>						
qGlc (pmol/cell.d)	-2.5 ± 0.3	-2.8 ± 0.4	-1.7 ± 0.5	-1.6 ± 0.2	-0.8 ± 0.1	-1.4 ± 0.2
qLac (pmol/cell.d)	1.13 ± 0.14	1.14 ± 0.18	1.15 ± 0.38	0.4 ± 0.07	0.23 ± 0.04	0.25 ± 0.02
<i>Metabolic rates post-induction</i>						
qGlc (pmol/cell.d)	-1.0 ± 0.2	-0.9 ± 0.2	-1.1 ± 0.2	-0.7 ± 0.1	-1.1 ± 0.2	-1.0 ± 0.1
qLac (pmol/cell.d)	-0.06 ± 0.01	-0.10 ± 0.02	-0.10 ± 0.02	-0.06 ± 0.01	-0.08 ± 0.02	-0.11 ± 0.02

The corresponding nutrient, metabolite and antibody concentration profiles are presented in Figure 5.2. As expected, delaying nutrient feeding led to an early reduction in glucose concentrations, the main source of carbon and energy in the basal medium. The lactate concentration profiles were all similar up to day 4, reaching a level of about 11 mM. It should be noticed that the induction was concomitant with the metabolic switch from lactate production to consumption for fed-batch cultures induced at a cell density of 4×10^6 cells/mL, while the metabolic switch had already occurred when the cells were induced at high cell density. The lactate metabolism switch was only temporary, as all the cultures ultimately exhibited a net reproduction of this metabolite towards the end (Figure 5.2B). Furthermore, the final concentration of ammonia in cultures induced at high cell density (3 – 3.5 mM) was lower compared to the cultures induced at intermediate cell density (5 - 6 mM), due to longer culture duration of the latter.

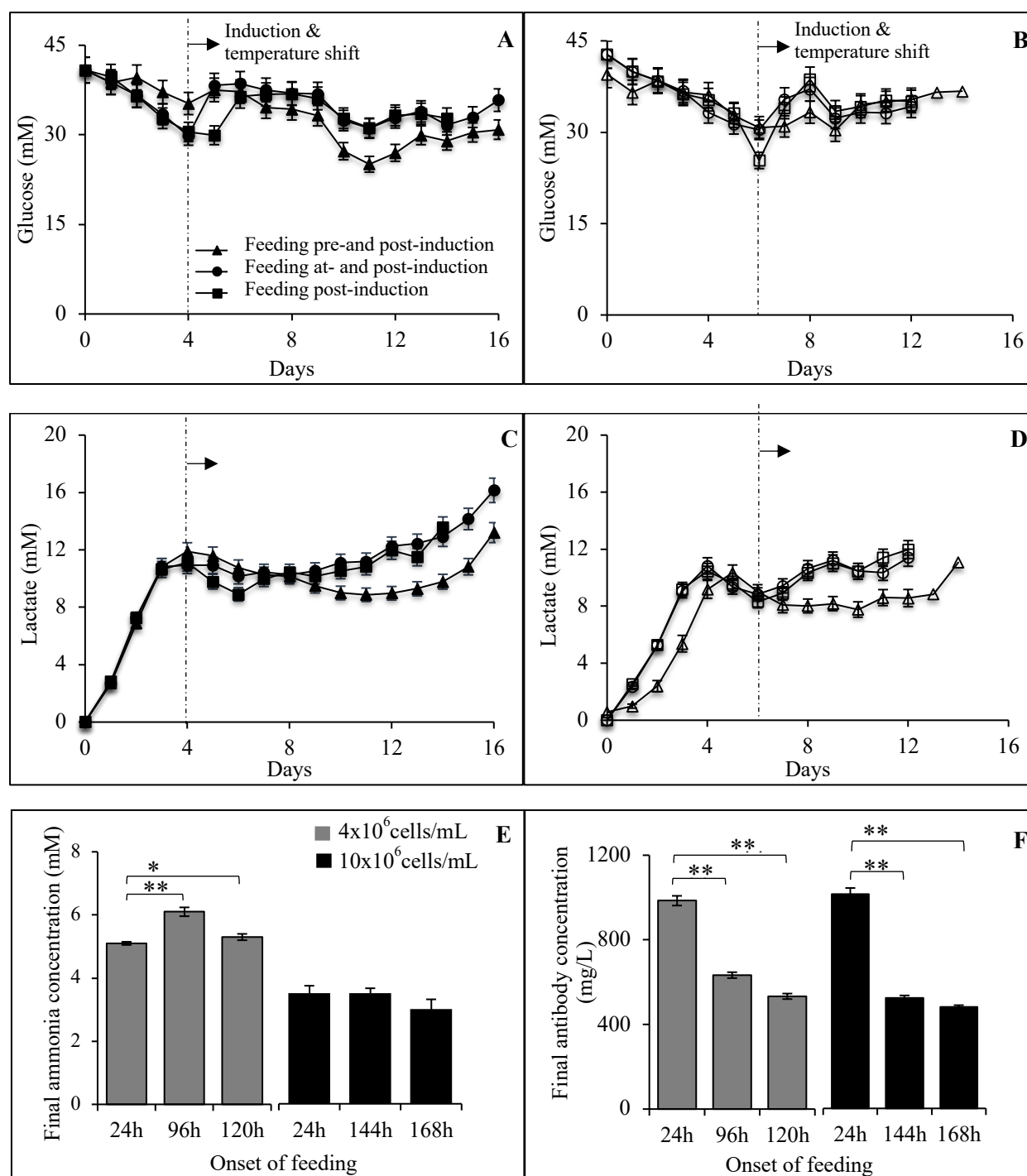


Figure 5.2 : Glucose (A & B) and lactate (C & D) profiles for fed-batch cultures with different feeding starting times. Feeding was initiated pre-induction (triangles), at the time of induction (circles) and post-induction (squares), corresponding to 24h, 96h and 120h, respectively. Final ammonia (E) and antibody (F) concentrations. Solid symbols and grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL.

cells/mL. The dash lines indicate the timing of induction. The temperature was shifted from 37 °C to 34 °C at the time of induction. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

During the growth phase (i.e. before induction), both the average cell specific glucose uptake and lactate production rates were higher in cultures induced at an intermediate cell density (Table 5.1). During the production phase, the average cell specific rates were generally reduced, but were all largely similar, irrespective of the cell density at induction or when the feed rate was started. Of importance, the final monoclonal antibody titer was consistently significantly greater in cultures where feeding was initiated early during the growth phase, whether the cultures were induced at an intermediate or high cell density. This augmentation can be mainly attributed to the aforementioned increased IVCC, since the cell specific productivities were only marginally higher (~10 vs ~8 pg/cell.d).

5.5.2 Impact of the feeding rate on culture performance

To investigate whether the availability of nutrients may affect cell growth and the final antibody titer, another set of small-scale cultures was performed in which the feed rate of the concentrated nutrient solution was varied. This was achieved by targeting three different glucose levels (25 mM, 35 mM and 50 mM) when applying the dynamic feeding strategy. The temperature was reduced from 37 to 34 °C for the production phase. The resulting integral of viable cell density and the final antibody concentration for each culture conditions are shown in Figure 5.3. The cell concentration profiles are provided as supplementary material (Figure 5.S1). The cultures with the lowest feed rate employed (i.e. corresponding to the glucose set point of 25 mM) exhibited the lowest growth and product yields. In fact, the final mAb titers achieved in these cultures were similar to the ones typically obtained under simple batch operation using the same basal medium (data not shown). Due to the high glucose concentration present in the basal medium, feeding started only on day 7 and the cumulative amount of concentrated nutrient solution supplied to these cultures was very low (Figure 5.3B).

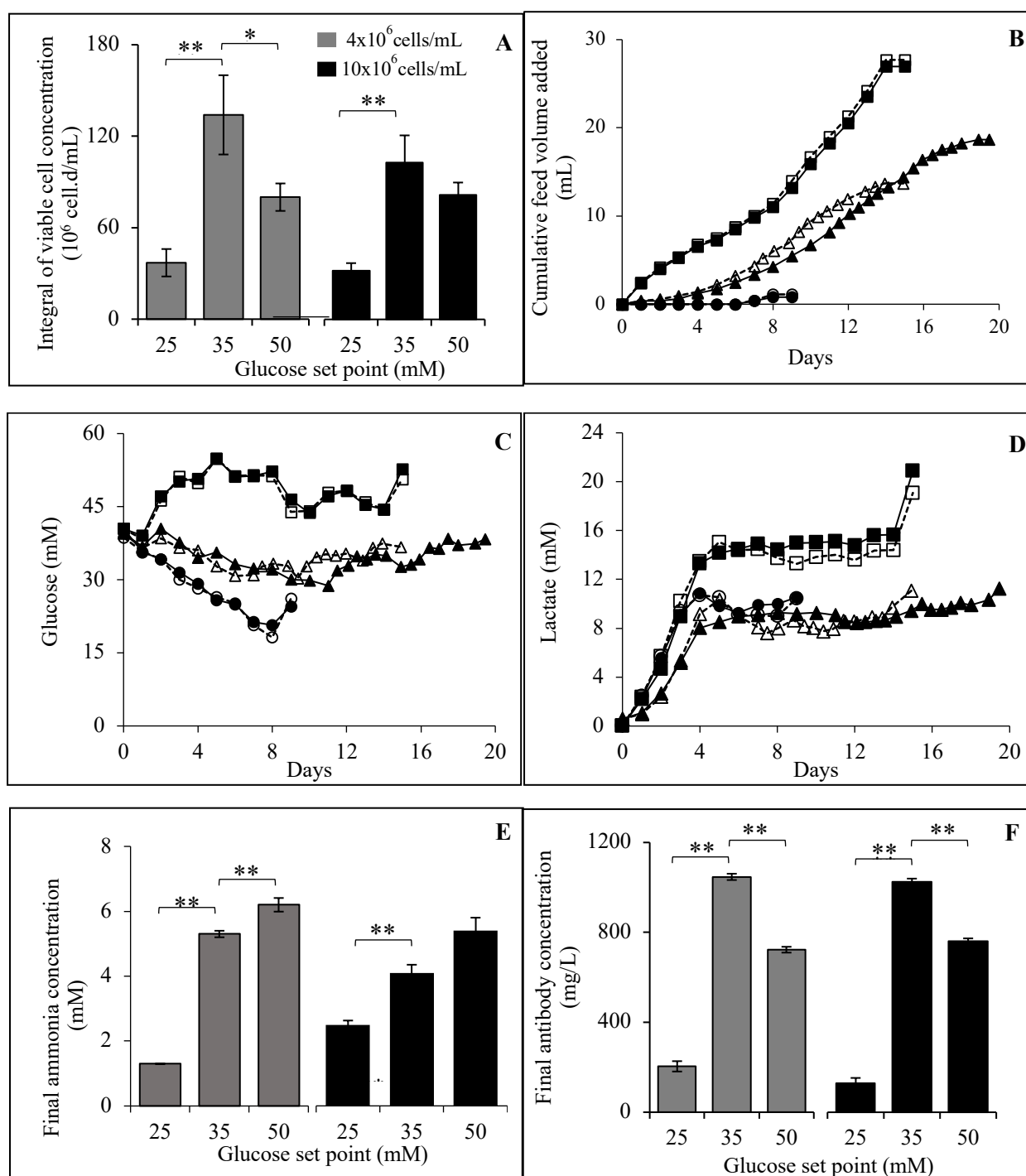


Figure 5.3 : Integral of viable cell (A), cumulative feed volume (B), glucose (C), lactate (D), final ammonia concentration (E) and final antibody concentration (F) in fed-batch cultures with different feed rates. Cultures were operated at low (circles), intermediate (triangles) and high (squares) feed rates, corresponding to glucose set-points of 25 mM, 35 mM and 50 mM, respectively. Solid

symbols and grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at $*p < 0.05$, $**p < 0.005$.

Both for the cultures induced at intermediate and high cell densities, the maximum final product titers (~ 1.05 g/L) were reached with a moderate feeding regime (i.e. glucose setpoint of 35 mM). The product yields were about 1.4-fold greater than for the cultures conducted with the highest glucose set point. Thus, the highest feed rate employed was not beneficial to culture performance, as it led to significant reductions in both the integral of viable cell density and product titer. Culture longevity had a determinant impact on the final antibody concentration and the fed-batch cultures operated with the highest feed rate exhibited a relatively similar cell specific productivity (Table 5.2), but the culture duration was reduced to 15 days.

The corresponding metabolite profiles are presented in Figure 5.3. Under all conditions, the consistent trend of rapid lactate accumulation during the exponential growth phase was observed. During the cultures operated with a high feed rate, a lactate concentration of 15 mM was reached on day 5, and was 1.5-fold greater than the initial peak concentrations attained under the other feeding regimes on days 4-5. It should be stressed that waste metabolite concentrations were diluted due to the concentrated feed solution supplemented to the cultures, especially under the highest feed regime. The cell specific glucose consumption and lactate production rates were significantly greater in the cultures performed with the highest feed rate, both during the growth and production phases (Table 5.2). Consistent with the results of Table 5.1, the rates were found to be reduced during the production phase, irrespective of the feed rate and most likely as a result of the temperature reduction at the time of induction and the ensuing slowdown in cell metabolism.

Table 5.2 : Cell specific rates in shake flask cultures with different feed rates and induced at 4×10^6 and 10×10^6 cells/mL. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments.

	Induction at 4×10^6 cells/mL			Induction at 10×10^6 cells/mL		
Glucose set-point	25 mM	35 mM	50 mM	25 mM	35 mM	50 mM
Feeding regime	Low	Intermediate	High	Low	Intermediate	High
μ (d^{-1})	0.53 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.62 ± 0.01
X_{\max} (10^6 cells/mL)	8.0 ± 0.9	14.0 ± 0.6	12.0 ± 0.3	10.0 ± 0.8	15 ± 1.5	12.0 ± 0.4
q_p^{avg} (pg/cell.d)	6.1 ± 1.6	8.1 ± 1.1	9.0 ± 1.3	4.0 ± 0.7	10.3 ± 1.4	9.2 ± 1.1
$q_{NH_3}^{avg}$ (pmol/cell.d)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01
<i>Metabolic rates pre-induction</i>						
qGlc (pmol/cell.d)	-2.3 ± 0.3	-2.8 ± 0.4	-4.4 ± 0.8	-1.0 ± 0.1	-1.6 ± 0.2	-2.2 ± 0.2
qLac (pmol/cell.d)	1.66 ± 0.26	1.27 ± 0.2	2.17 ± 0.41	0.49 ± 0.09	0.4 ± 0.07	1.18 ± 0.14
<i>Metabolic rates post-induction</i>						
qGlc (pmol/cell.d)	-0.4 ± 0.1	-0.7 ± 0.2	-0.9 ± 0.2	-0.8 ± 0.2	-0.7 ± 0.1	-0.9 ± 0.2
qLac (pmol/cell.d)	-0.01 ± 0.01	-0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.04	-0.19 ± 0.03	-0.06 ± 0.01	0.15 ± 0.03

5.5.3 Impact of the temperature shift at induction

In order to determine how mild-hypothermia conditions post-induction affects cell growth and product titer, different temperature shifts at induction were tested in both batch and fed-batch cultures (Figure 5.4). The same feeding strategy with a setpoint of 35 mM glucose was applied for all fed-batch cultures and was initiated from day one of the culture. In line with the previous experiments, the effect of temperature was assessed for both intermediate (4×10^6 cells/mL) and high cell density (10×10^6 cells/mL) at induction. In batch cultures, an improvement in terms of the integral of viable cell density was noted when the temperature was reduced to 30 °C under both induction conditions, whether the temperature during the growth phase was 37 or 34 °C (Figure 5.4A). The corresponding final antibody concentrations followed the same trend (Figure 5.4B). Maximum antibody titers in the range of 550 to 600 mg/L were obtained in the cultures operated at 30 °C during the production phase (a 3-fold improvement compared to the control cultures maintained at 37 °C) and this was due to extended culture durations, since the cell specific productivity was similar in the majority of the batch cultures (6-8 pg/cell.d), except for the culture conducted at 37 °C where the specific productivity was only 3-4 pg/cell.d.

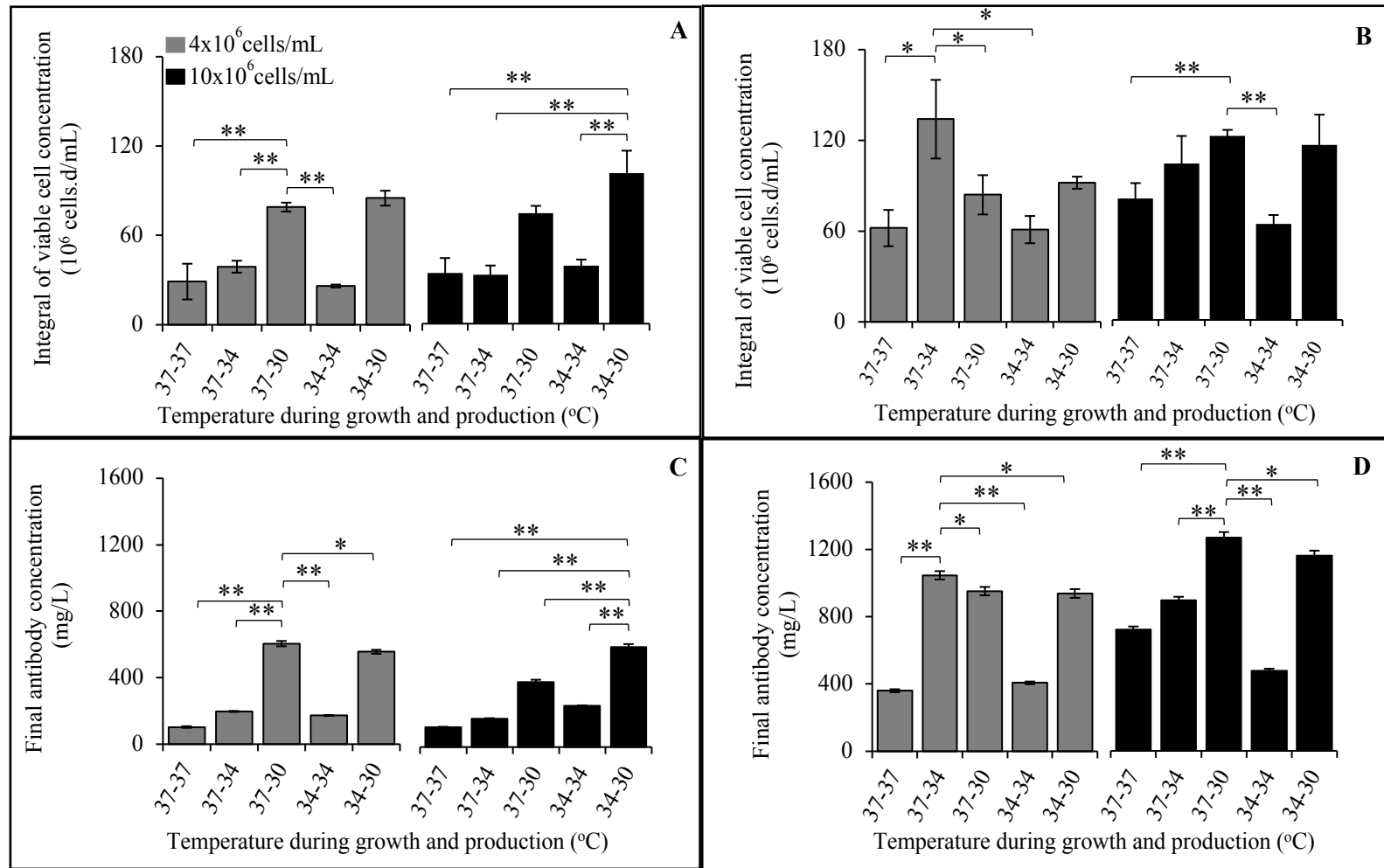


Figure 5.4 : Integral of viable cell concentration and antibody concentration in batch (A & C) and fed-batch (B & D) cultures with different temperature shifts at induction. Grey bars represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL and black bars represent cultures induced at 10×10^6 cell/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures. Asterisks indicate significance at * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

When the same temperature conditions were applied in fed-batch cultures, there was greater variability between the cultures induced at 4×10^6 cells/mL and 10×10^6 cells/mL. For the cultures induced at high cell density, a temperature shift to mild hypothermia during production consistently led to an increase in the integral of viable cell density and the final antibody concentration, irrespective of the culture temperature during the growth phase (either 37 or 34 °C). An improvement of at least 1.5- to 2-fold in terms of IVCC was observed and the maximum antibody concentrations reached were 1.7 to 2.4-fold greater (1.2 g/L) compared to the cultures performed without a temperature shift. The greatest improvement corresponded to the cultures operated at 37 °C during the growth phase and downshifted to 30 °C for the production phase.

In fed-batch cultures induced at an intermediate cell density, mild hypothermia conditions were also systematically beneficial in terms of IVCC and antibody titers. However, the maximum IVCC and product yields were obtained when the temperature was switched from 37 °C to 34 °C. In addition, our results demonstrate that initiating and maintaining the cultures at 34°C had no positive impact on product titer when compared to the cultures performed at 37 °C during the growth phase. But further reducing the temperature to 30 °C during the production phase was associated with an increase in cell specific productivity for both induction conditions (Table 5.3). The cell concentration, cell viability, glucose and lactate profiles for the fed-batch cultures are provided as supplementary material (Figures 5.S2 and 5.S3).

Table 5.3 : Cell specific rates in shake flask cultures with different temperature shifts. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate experiments

Temperature (growth-production)	Fed-batch cultures induced at 4×10^6 cell/mL				
	37-37	37-34	37-30	34-34	34-30
μ (d ⁻¹)	0.62 ± 0.01	0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02
q_P^{avg} (pg/cell.d)	5.8 ± 1.4	7.9 ± 1.7	11.3 ± 1.8	6.7 ± 1.1	10.2 ± 0.7
$q_{NH_3}^{avg}$ (pmol/cell.d)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01
<i>Metabolic rates pre-induction</i>					
qGlc (pmol/cell.d)	-2.6 ± 0.4	-2.7 ± 0.4	-2.9 ± 0.4	-1.8 ± 0.4	-2.2 ± 0.3
qLac (pmol/cell.d)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2
<i>Metabolic rates post-induction</i>					
qGlc (pmol/cell.d)	-0.7 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	-0.7 ± 0.2	-0.7 ± 0.3	-1.1 ± 0.2
qLac (pmol/cell.d)	0.07 ± 0.01	-0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Temperature (growth-production)	Fed-batch cultures induced at 10×10^6 cell/mL				
	37-37	37-34	37-30	34-34	34-30
μ (d ⁻¹)	0.58 ± 0.01	0.65 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.50 ± 0.02
q_P^{avg} (pg/cell.d)	8.9 ± 0.6	8.6 ± 1.6	10.3 ± 1.1	7.5 ± 0.9	9.9 ± 1.9
$q_{NH_3}^{avg}$ (pmol/cell.d)	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
<i>Metabolic rates pre-induction</i>					
qGlc (pmol/cell.d)	-1.9 ± 0.3	-1.5 ± 0.3	-1.4 ± 0.2	-1.1 ± 0.2	-1.4 ± 0.3
qLac (pmol/cell.d)	0.4 ± 0.1	0.06 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.5 ± 0.09	0.12 ± 0.02
<i>Metabolic rates post-induction</i>					
qGlc (pmol/cell.d)	-0.9 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	-0.7 ± 0.1	-0.4 ± 0.1	-1.3 ± 0.2
qLac (pmol/cell.d)	0.03 ± 0.01	-0.06 ± 0.01	-0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	-0.08 ± 0.0

Cultures performed without temperature reduction showed an accumulation of lactate until the end of cultivation. However, the metabolic switch to lactate consumption observed in the other cultures did not always coincided with the change to mild hypothermia conditions. In particular, in the cultures induced at high cell density, the shift from lactate production to its consumption appeared before the induction and thus the reduction of temperature.

Cultivating cells at the physiological temperature of 37 °C during the growth phase presented slightly higher cell specific growth rates and glucose uptake rates than the cultures initiated at 34 °C (Table 5.3). During the production phase, the cell specific rates were reduced when compared to the growth phase, even in fed-batch cultures without a temperature shift.

5.5.4 High cell density induction in fed-batch bioreactors

Two parallel fed-batch cultures were carried out in 2L stirred tank bioreactors. Based on the small-scale results yielding the highest product titers for the high cell density induction, the first bioreactor was started at 37°C and the second one was initiated at 34°C. The same feeding strategy was applied from day one of each bioreactor. Cultures were allowed to reach 10×10^6 cells/mL before proceeding with the induction and switching the temperature to 30 °C in both bioreactors. The two bioreactor cultures were inoculated at a cell density of 0.5×10^6 cells/mL and reached maximum viable cell concentrations of 14×10^6 cells/mL and 12×10^6 cells/mL for temperatures of 37 and 34 °C, respectively. The average cell specific growth rate was 1.4-fold greater at 37 °C (0.6 d^{-1} compared to 0.5 d^{-1} at 34 °C) and, as a result, the induction times were offset by 24 h (Figure 5.5A) and took place on day 5 for the first bioreactor and on day 6 for the second.

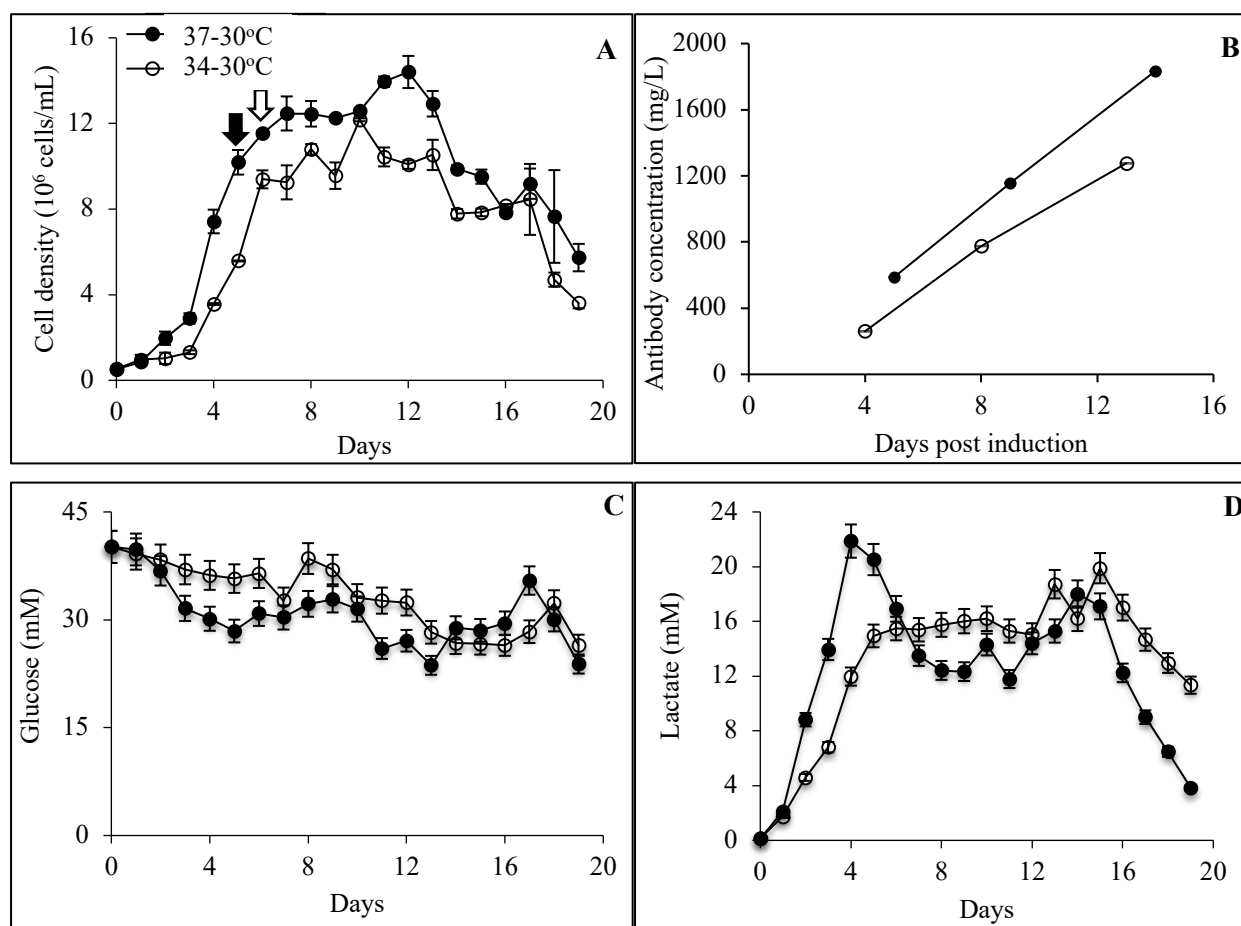


Figure 5.5 : Time profiles of viable cells (A), antibody (B), glucose (C) and lactate (D) concentrations in fed-batch bioreactor cultures operated at 37 °C (solid symbols) and 34 °C (open symbols) during the growth phase pre-induction. Arrows indicate the timing of induction, corresponding to a cell density of 10×10^6 cells/mL. The temperature was reduced to 30 °C at induction. Error bars represent standard deviations of duplicate samples.

Reducing the temperature to 30 °C at the time of induction caused the slowdown of growth and a fast transition to the stationary phase for the culture initiated at 34 °C, while the cells continued to grow post-induction in the first bioreactor. Nevertheless, cell viability was maintained well over 90 % for 17 days in both bioreactors. The highest antibody titer (1.8 g/L) was achieved in the first bioreactor (37-30) and was 1.5-fold higher than the bioreactor conducted at 34-30 °C. This was mostly attributable to a significant increase in the integral of viable cell density (Table 5.4). The highest product titer in bioreactor was also 1.5-fold greater than the yields obtained in shake flasks

operated at either 37-30 °C or 34-30 °C temperature conditions. The cell specific productivities were slightly higher in bioreactor, most likely due to the better controlled environmental conditions.

Table 5.4 : Cell specific rates in high cell density induction fed-batch bioreactor cultures. Data shown are mean \pm SD derived from duplicate measurements

Temperature	37-30 °C	34-30 °C
μ (d ⁻¹)	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
IVCC (10 ⁶ cell.d/mL)	143 \pm 30	103 \pm 7
q_P^{avg} (pg/cell.d)	13.0 \pm 2.8	12.4 \pm 1.3
$q_{NH_3}^{avg}$ (pmol/cell.d)	0.010 \pm 0.002	0.020 \pm 0.001
<i>Metabolic rates pre-induction</i>		
qGlc (pmol/cells.d)	-1.9 \pm 0.3	-1.0 \pm 0.2
qLac (pmol/cell.d)	1.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1
<i>Metabolic rates post-induction</i>		
qGlc (pmol/cells.d)	-0.8 \pm 0.1	-0.8 \pm 0.2
qLac (pmol/cell.d)	-0.06 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01

During the initial days of the 37-30 °C bioreactor culture, lactate was produced and reached a maximum concentration of 22 mM on day 4. During the following cultivation days, a lactate shift occurred and this metabolite was overall consumed and the final concentration at harvest was 4 mM. The 34-30 °C culture exhibited a lower lactate production which reached 15 mM on day 5, followed by a slow steady increase and a shift to lactate consumption towards the end of the culture. The consumption of lactate during the late stage of the bioreactor cultures is in sharp contrast with the profiles observed in uncontrolled shake flask cultures (Figure 5.3D, Figure 5.2D). The final ammonia concentration was around 2 mM for both bioreactor cultures, which exhibited lower cell specific production rates of ammonia compared to the shake flask cultures conducted at similar induction conditions (Table 5.4).

5.5.5 Glycan distribution in bioreactor culture

Glycosylation is a critical determinant of antibody effector functions and the biopharmaceutical industry has devoted increasing efforts to identify the parameters that impact the product glycan distribution during biomanufacturing. Given its impact on cell metabolism, protein expression rate and culture longevity, temperature is one of the process parameter that can critically impact product glycosylation. We have analyzed the product glycan distribution resulting from the two bioreactor cultures operated at different temperatures during the growth phase. To get some insights about the time evolution of the glycan distribution, samples were collected at 11 and 14 days post-induction (dpi) for the 37-30 bioreactor culture, and at 10 and 13 dpi for the 34-30 run. In both cases, the first sampling time corresponded to high cell viability (>95%) and the second one to the culture harvest (~60% viability). The resulting glycan distributions obtained via HILIC analysis are presented in Figure 5.6.

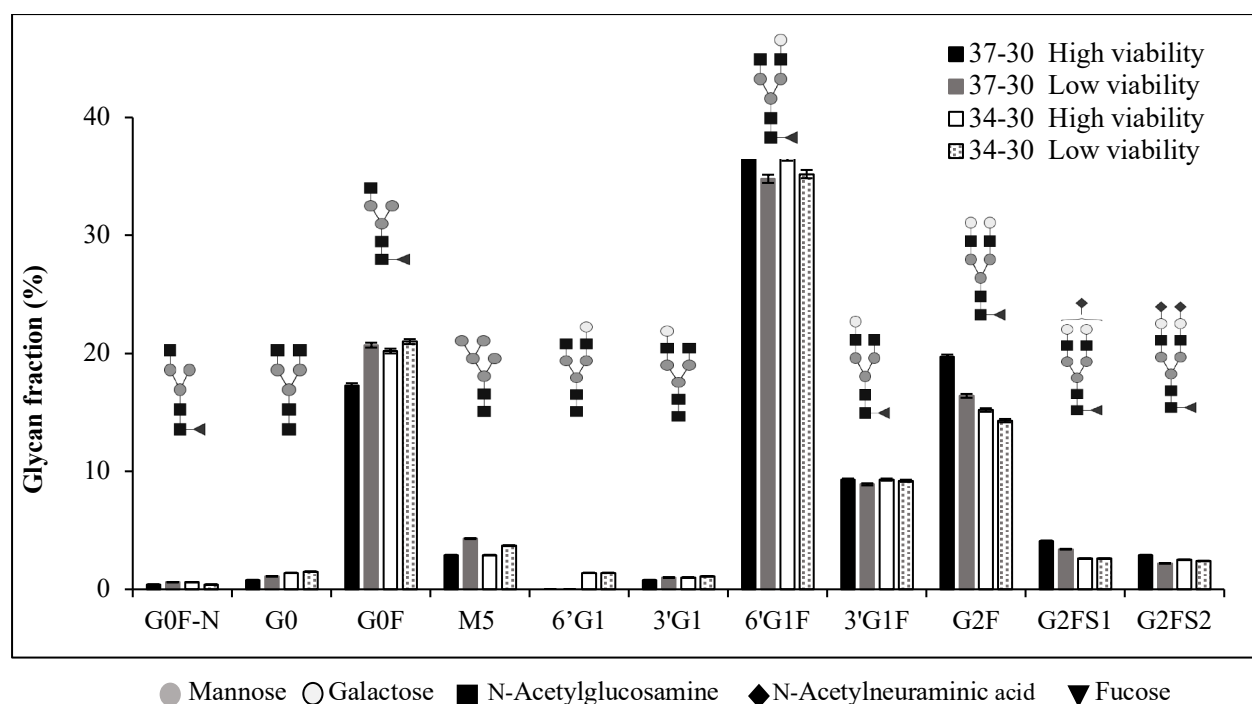


Figure 5.6 : Glycan distribution profile in fed-batch bioreactor cultures induced at high cell density. Samples were collected when high viability conditions were prevailing (11 dpi for the 37-30 culture and 10 dpi for the 34-30 culture) and at harvest (14 dpi for the 37-30 culture and 13 dpi for the 34-30 culture). Error bars depict standard deviations of duplicate injections.

The results indicate that cultivating the cells at physiological temperature during the growth phase yielded slightly higher percentages of galactosylation, sialylation and fucosylation (Table 5.5). It is also apparent from Figure 5.6 that culture duration had an impact on the glycosylation profile, as the fraction of agalactosylated glycans was higher at culture harvest under reduced cell viability conditions. Interestingly, the culture performed at 34-30 °C showed much less variation over time with respect to the glycan distribution.

Table 5.5 : Galactosylation (GI), sialylation (SI) and fucosylation (FI) indexes during high and low viability for fed-batch bioreactor cultures. Errors were derived via error propagation from standard deviations of duplicate injections.

	37-30 °C		34-30°C	
	<i>High viability</i> (11 dpi)	<i>Low viability</i> (14 dpi)	<i>High viability</i> (10 dpi)	<i>Low viability</i> (13 dpi)
GI	0.54 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.48 ± 0.03
SI	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02
FI	0.95 ± 0.03	0.93 ± 0.03	0.92 ± 0.03	0.91 ± 0.03

5.6 Discussion

In the present study, different fed-batch culture strategies were evaluated in an effort to increase antibody titer for an inducible CHO cell line. The use of an inducible expression system provides an added flexibility that can be exploited in the context of process design and optimization, as specific conditions can be set for the growth and production phases. The general approach consists on growing cells rapidly to a desired cell density and then trigger the production of the protein of interest by adding the appropriate inducing agent. However, previous works have demonstrated the critical importance of the timing of induction on the overall process performance (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). In batch, increasing the cell density at induction was found to decrease the cell specific productivity (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a), probably due to key nutrient limitations. This creates an undesired trade-off between maximizing biomass growth and

maximizing the cellular productivity during the post-induction phase. To overcome the bottlenecks encountered in batch, we have explored the use of a fed-batch mode to further increase the product yield. All the cultivation strategies developed in the present study were assessed at both an intermediate and a high cell density at induction to highlight potential limitations similar to those encountered in batch, and also since the timing of induction is a critical parameter to optimize for inducible systems. The aim was to identify the most suitable combination of fed-batch strategy and induction time to get the highest product titer and ensure that a high product quality is maintained.

The general goal of any fed-batch strategy is to jointly maximize the integral of viable cells and the specific antibody secretion rate, which should translate into an increase of the final product titer (T. A. B. a. D. K. Robinson, 1995; Sauer et al., 2000). This culture mode still constitute the most common choice for industrial production due to its operational simplicity (Birol, Ündey, & Cinar, 2002; Mears et al., 2017). Fed-batch strategies are based on continuous or periodic nutrient supplementation and the most important questions in the design of any feeding strategy are: what, when and how much. The “what” question refers to the nature and composition of the nutrient feed solution. Custom feed solutions can be rationally designed based on the determination of the cell specific requirements and/or based on empirical high-throughput approaches (Rouiller et al., 2013; Xie & Wang, 1994b). For the present study, we have screened among different commercially available concentrated feed solutions at small-scale for growth and productivity (data not shown). Unfortunately, as with medium formulations, the composition of commercial concentrated feed solutions is generally complex and proprietary. Glucose and glutamine are usually the main carbon and energy sources present in cell culture media/feeds (C Altamirano et al., 2000; Paredes et al., 1999; Petch & Butler, 1994). Since the cell line used in our study harbors the glutamine synthetase system (Poulain et al., 2017), these cells can grow in a glutamine-free medium, thereby reducing the accumulation of ammonia and allowing extended fed-batch operation. Thus, in all the dynamic fed-batch strategies performed, the concentrated nutrient solution was fed to the cultures based on maintaining a predefined glucose concentration setpoint.

The “when” question refers to the timing for feeding the culture. In this work, we tested three different feeding start times that were established relative to the moment of culture induction. Adding the concentrated solution from the beginning of the culture proved to be beneficial when compared to cultures fed only during the production phase, particularly for the cultures induced at an intermediate cell density. It can thus be inferred that the concentrated feed solution brought

additional components promoting growth or prevented early nutrient limitations. Also of importance, the early feeding strategy was not associated with greater lactate or ammonia accumulation at the end of the cultures.

In line with the previous statement, the “how much” interrogation in the development of fed-batch strategies should be carefully investigated to avoid drastic physico-chemical changes (e.g pH, osmolality) or the accumulation of inhibitory metabolic by-products and other components that may become cytotoxic at high concentrations. The high feeding regime tested in our study had no negative impact on the cell specific growth rate before induction, but did not yield the best culture performance in terms of cell growth and productivity. Instead, the highest viable cell densities and culture durations were attained in the cultures under a moderate feeding regime, and this led to the highest antibody titers for both induction conditions. Unfortunately, osmolality was not measured in our fed-batch cultures, but it is quite possible that the concentrated nutrient bolus additions may have contributed to the inhibition of growth and protein yield by the hyperosmotic pressure (Dean & Reddy, 2013; M. S. Lee & Lee, 2001; X. Zhang, Garcia, Baldi, Hacker, & Wurm, 2010; M. M. Zhu et al., 2005). When feeding a commercial concentrated solution, a multitude of compounds such as growth factors, hormones, salts, vitamins and amino acids are added to the culture. These may not all be needed by the cells or they may be required at much lower levels than supplied. Many components, such as vitamins and minerals were found to be nontoxic even at concentrations one or two orders of magnitude higher than the cells’ requirements (Xie & Wang, 1994b). However, it is well known that high concentrations of some amino acids may cause cell growth and productivity inhibitions as recently reviewed by Pereira et al. (Pereira, Kildegaard, & Andersen, 2018). Since the amino acids composition of the concentrated feed we used was not specifically optimized for our cell line, the application of a moderate feeding regime provided a more well-balanced amount of nutrients which favored the longevity of the cultures (C Altamirano et al., 2000; Xing et al., 2011).

The most important challenge in the operation of fed-batch cultures remains the accumulation of metabolic by-products at inhibitory or toxic levels. Lactate is the main waste metabolite derived from glucose metabolism that can cause growth inhibition and decrease recombinant protein productivity (Sun et al., 2013). In the present study, CHO cells were exposed to residual glucose concentrations in the range of 20 to 55 mM, but the maximum lactate concentrations reached were all between 12 mM to 22 mM. These concentrations were well below the levels (40-60 mM)

commonly reported to be growth-inhibiting for CHO cells (Ivarsson, Villiger, Morbidelli, & Soos, 2014; Xing, Li, Chow, & Lee, 2008). Furthermore, numerous studies have established a positive correlation between the occurrence of a switch in lactate metabolism and the productivity of recombinant protein in stable CHO cell clones (Fiona et al., 2018; Le et al., 2012; Seth et al., 2006). Under most of the conditions tested, irrespective of the feeding regime employed, the lactate profile was characterized by a high production during the first 4 days of cultivation, followed by a temporary phase during which lactate was slightly consumed. Shake flask cultures exhibited a lactate re-accumulation phase towards the end of cultures, whereas lactate was significantly consumed during the late stage of bioreactor runs. This difference is likely due to the pH control present in the latter, as observed by others (Xu et al., 2018). High ammonia concentrations (>5 mM) have been reported to inhibit cell growth and to decrease antibody cell specific productivity (Gawlitsek, Papac, Sliwowski, & Ryll, 1999; Ha & Lee, 2014; Hong et al., 2010; Reuveny, Velez, Macmillan, & Miller, 1986; Xing et al., 2008; Yang & Butler, 2000). We employed a GS-engineered cell line, which can generate glutamine from ammonia and glutamate, thereby contributing to reduce the accumulation of ammonia in the culture environment (F. Zhang et al., 2006).

Maintaining high cell viability over a prolonged period is typically an effective way to improve the production yield in mammalian cell cultures (S Oguchi et al., 2003). Hence, a common optimization approach is to grow cells to moderately high cell density and then induce a prolonged productive stationary phase by applying a change in temperature (mild hypothermia conditions) or pH (Quek, Dietmair, Krömer, & Nielsen, 2010). Because of its intricate impacts on cell cycle, apoptosis, metabolism and protein synthesis, temperature is the most commonly manipulated variable to improve culture performance via a biphasic process strategy (Yuanxing Zhang, 2009). We have thus examined the effect of temperature shifts on cell growth and antibody production in small-scale cultures and under more controlled conditions in bioreactors. Lowering the temperature from 37 °C to either 34 °C or 30 °C during the production phase had a beneficial impact on product yields, whether the cultures were induced at intermediate or high cell density. The enhanced antibody production was not just the result of an extended culture duration, but was also associated with a greater cell specific productivity. The relationship between temperature and cell growth has been extensively discussed in the case of constitutive expression (Kaufmann, Mazur, Fussenegger, & Bailey, 1999). Temperature reduction were also associated with enhanced cell specific production in CHO cells, for instance in the case of EPO (Yoon, Kim, et al., 2003),

t-PA (Berrios, Diaz-Barrera, Bazan, & Altamirano, 2009) and TNFR-Fc (Kou, Fan, Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011). Several genes such as those involved in ribosome biogenesis and protein translation were found highly expressed in the G1 phase (Kumar et al., 2007). Temperature reduction is also associated with an overall slowdown of cell metabolism, as we have observed by comparing the cell uptake/production rates during the growth and production phases. The reduction in glucose and amino acids uptake rates will in turn lower the production of lactate and ammonia (Kou, Fan, Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011; Moore et al., 1997; Trummer et al., 2006; Wong et al., 2006; Yoon, Kim, et al., 2003). This may contribute in part to the prolonged culture duration and high cell viability (Kou, Fan, Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011).

Several factors can influence the glycosylation pattern of recombinant antibodies, including the host cell line, the medium formulation and process conditions. In particular, culture pH, by-product accumulation and nutrient limitations have all been reported to have a direct impact on protein quality (Borys et al., 1993; Ha, Kim, & Lee, 2015; Rivinoja, Hassinen, Kokkonen, Kauppila, & Kellokumpu, 2009; Villacrés et al., 2015). Temperature is another parameter that has been widely studied with respect to glycoform quality in CHO cells culture (Ahn et al., 2008; Bollati-Fogolin et al., 2005; Hossler et al., 2009). In their study, Ahn *et al.* performed different temperature shifts and found that a temperature of 32 °C was the most satisfactory condition to promote EPO production and to maintain product quality attribute, but further reduction (30 °C and below) was found to negatively impact the glycosylation pattern (Ahn et al., 2008). In our work, we have analyzed the glycosylation profiles corresponding to the two conditions that have yielded the highest product yields, that is, cultures initiated at 37 and 34°C, then downshifted to 30 °C during the production phase. Using a physiological temperature during the growth phase led to an initially slightly higher percentage of galactosylation, but the mono- and di-galactosylated glycans decreased more over time and, as a result, the glycosylation patterns at harvest were similar in both bioreactor conditions. Alteration of the glycosylation profile may occur as a result of proteases and glycosidases release (Ana Rita Costa et al., 2014), particularly towards the end of cultures when cell viability is low. Mild-hypothermia conditions reduce proteolytic activity of degrading enzymes and can usually sustain high cell viability (Meuwly et al., 2006). Ammonia accumulation is also commonly reported to have a negative effect on product glycosylation even at low concentrations (Peifeng Chen & Sarah W Harcum, 2006; Ha & Lee, 2014). However, the final ammonia levels reach in our bioreactor cultures was only around 2 mM and is thus unlikely to have been a major factor. Temperature reduction was previously shown to reduce sialic acid

content (Kaufmann et al., 1999; Trummer et al., 2006). In our study, we observed no significant difference related to the temperature employed during the growth phase and the sialylation index was also not correlated with changes in cell viability, although the level of sialylation was fairly low in all the samples that were analyzed.

5.7 Conclusion

Process operating conditions that can promote high cell specific productivity as well as maintain a high viable cell density over a prolonged time are required to maximize the product yield in fed-batch cultures. In the case of a biphasic process employing an inducible cell line, the timing of induction is a critical parameter to investigate in the establishment of an efficient production protocol. We have assessed various combinations of feeding regimes, cell density at induction and temperature reduction strategies to identify the conditions resulting in the maximum antibody titers. We demonstrated the beneficial effect of feeding the cultures early (i.e. pre-induction) and we also showed that the feed rate must be adequately balanced to maximize cell growth and product yield. Finally, the use of mild-hypothermia conditions during the production phase was shown to be critical to achieve a productive high cell density induction. Further increasing the cell density at induction could be envisioned with the use of a perfusion mode, but the impact on the overall process productivity and the long-term production stability would need to be assessed.

5.8 Acknowledgments

We would like to thank Mr. Denis Brochu and Mr. Michel Gilbert from Human Health Therapeutics Research Center at National Research Council Canada (Ottawa) for performing HILIC analysis, Mr. Florian Cambay from Polytechnique Montreal for performing SPR analysis. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-06407). This is NRC publication XXX.

5.9 Supplementary figures

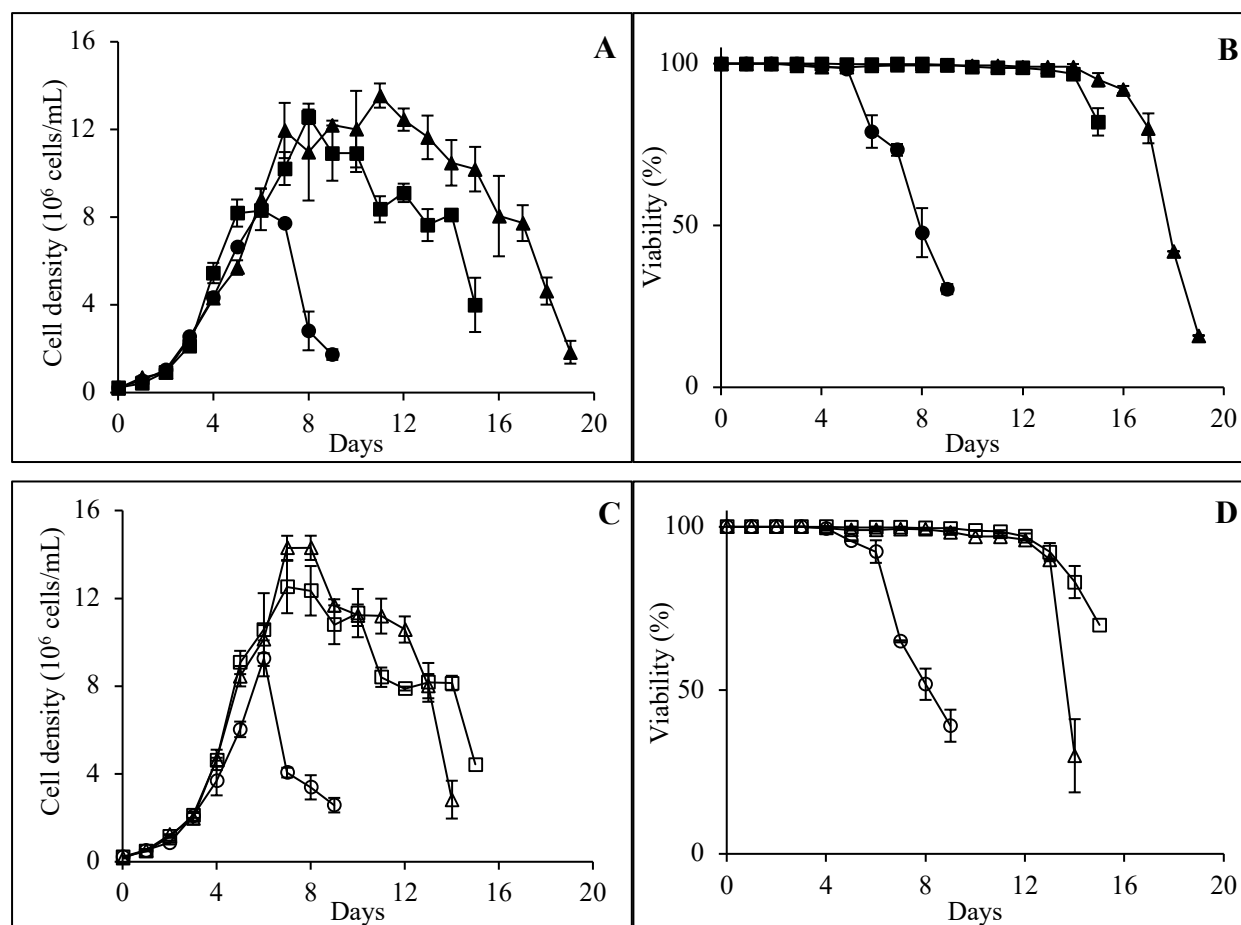


Figure 5.S1 : Cell concentration (A & C) and cell viability (B & D) profiles in fed-batch cultures with different feed rates. Cultures were operated at low (circles), intermediate (triangles) and high (squares) feed rates, corresponding to glucose set-points of 25 mM, 35 mM and 50 mM, respectively. Solid symbols represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.

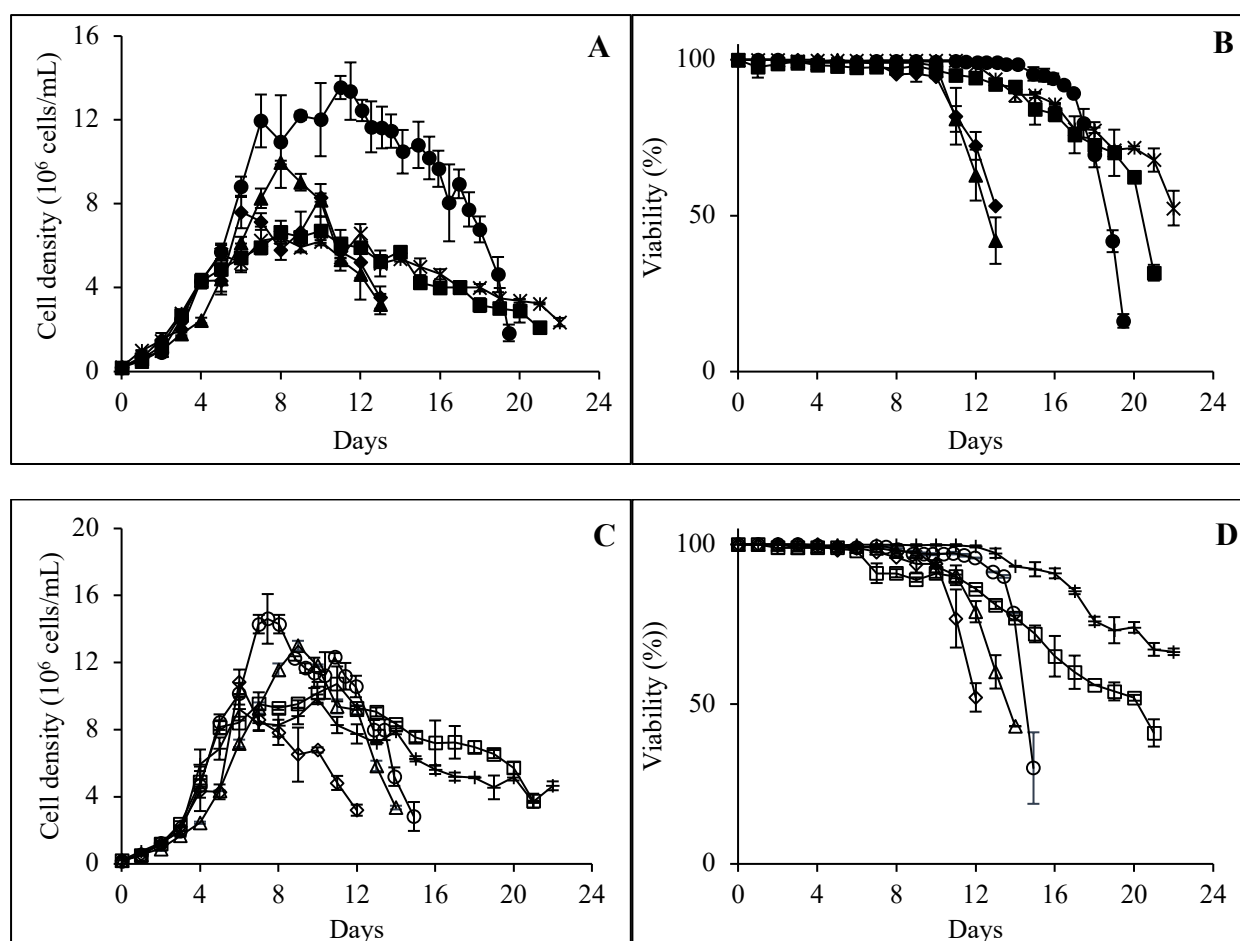


Figure 5.S2 : Cell density (A & C) and cell viability (B & D) profiles for fed-batch cultures operated at different temperatures during the growth and production phases: 37-37 (triangles), 37-34 (circles), 37-30 (squares), 34-34 (diamonds), 34-30 (crosses). Solid symbols represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.

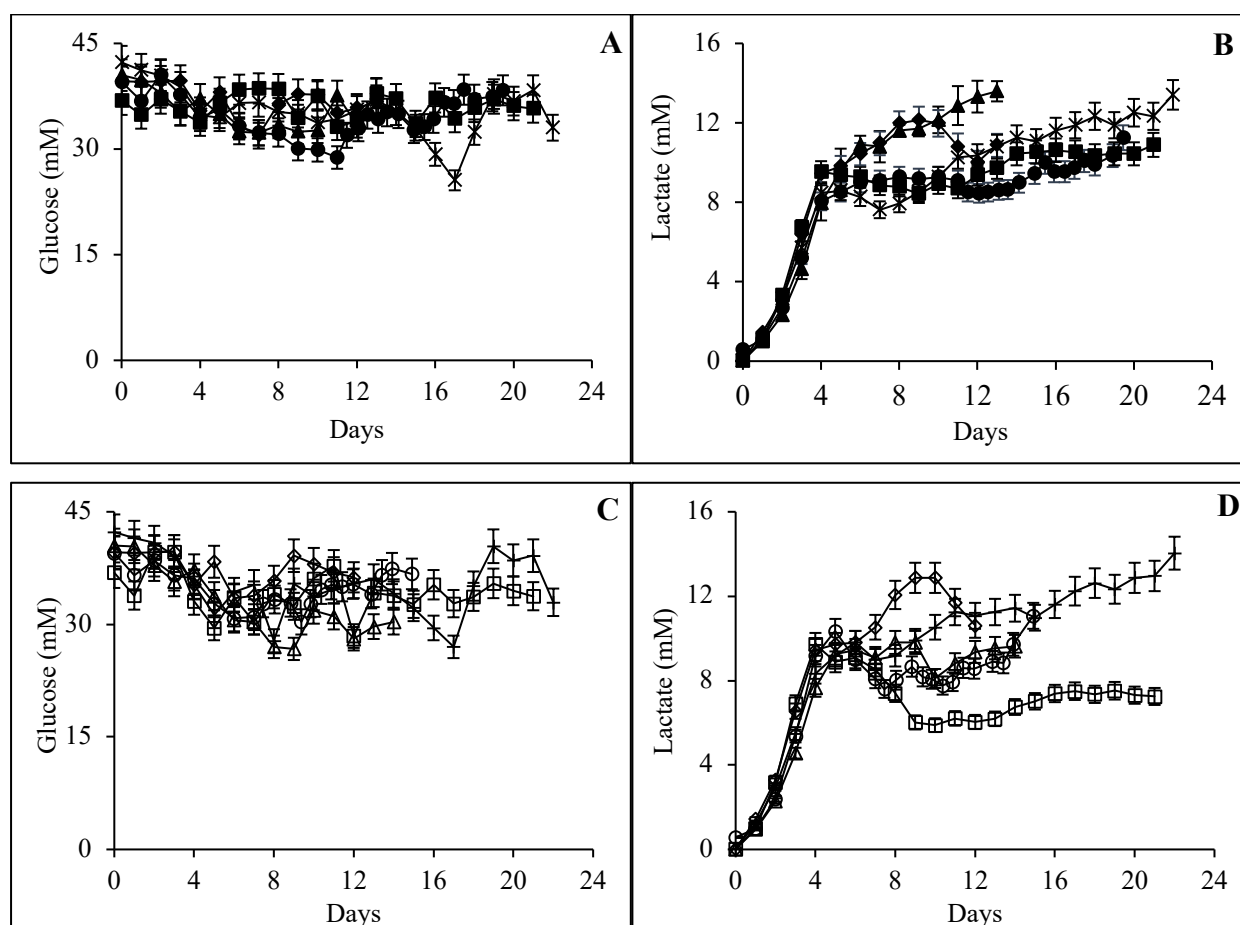


Figure 5.S3 :Glucose (A & C) and lactate (B & D) profiles for fed-batch cultures operated at different temperatures during the growth and production phases: 37-37 (triangles), 37-34 (circles), 37-30 (squares), 34-34 (diamonds), 34-30 (crosses). Solid symbols represent cultures induced at 4×10^6 cells/mL, open symbols represent cultures induced at 10×10^6 cells/mL. Error bars represent standard deviations of duplicate cultures.

5.10 References

- Aehle, M., Schaepe, S., Kuprijanov, A., Simutis, R., & Lübbert, A. (2011). Simple and efficient control of CHO cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 153(1), 56-61.
- Ahn, W. S., Jeon, J. J., Jeong, Y. R., Lee, S. J., & Yoon, S. K. (2008). Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(6), 1234-1244.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J., & Godia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547-556.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69-75.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Berrios, J., Diaz-Barrera, A., Bazan, C., & Altamirano, C. (2009). Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese hamster ovary cells cultured in mannose at low temperature. *Biotechnol Lett*, 31(10), 1493-1497. doi:10.1007/s10529-009-0050-1
- Biol, G., Ündey, C., & Cinar, A. (2002). A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Computers & Chemical Engineering*, 26(11), 1553-1565.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: Effect on productivity and product quality. *Biotechnology Progress*, 21(1), 17-21.
- Borys, M. C., Linzer, D. I., & Papoutsakis, E. T. (1993). Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Nature Biotechnology*, 11(6), 720.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8(2), 123-132.
- Chon, J. H., & Zarbis-Papastoitsis, G. (2011). Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New biotechnology*, 28(5), 458-463.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical reviews in biotechnology*, 34(4), 281-299.
- Cruz, H., Freitas, C., Alves, P., Moreira, J., & Carrondo, M. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and microbial technology*, 27(1), 43-52.
- De Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C., & Archambault, J. (1993). Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. *Bioprocess Engineering*, 9(1), 13-21.

- Dean, J., & Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1735-1747.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Fiona, H., Tracy, W., Vicky, C., & Karl, M. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 0(0). doi:doi:10.1002/bit.26603
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6), 1328-1337.
- Gaillet, B., Gilbert, R., Amziani, R., Guilbault, C., Gadoury, C., Caron, A. W., . . . Massie, B. (2007). High-Level Recombinant Protein Production in CHO Cells Using an Adenoviral Vector and the Cumate Gene-Switch. *Biotechnology Progress*, 23(1), 200-209.
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., . . . Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(2), 203-215.
- Gawlitczek, M., Papac, D. I., Sliwowski, M. B., & Ryll, T. (1999). Incorporation of ¹⁵N from ammonium into the N-linked oligosaccharides of an immunoadhesin glycoprotein expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, 9(2), 125-131.
- Gong, X., Li, D., Li, X., Fang, Q., Han, X., Wu, Y., . . . Shen, B. Q. (2006). Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media. *Cytotechnology*, 52(1), 25-38.
- Gowtham, Y. K., Saski, C. A., & Harcum, S. W. (2017). Low glucose concentrations within typical industrial operating conditions have minimal effect on the transcriptome of recombinant CHO cells. *Biotechnology Progress*, 33(3), 771-785.
- Ha, T. K., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2015). Understanding of altered N-glycosylation-related gene expression in recombinant Chinese hamster ovary cells subjected to elevated ammonium concentration by digital mRNA counting. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(8), 1583-1593.
- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of Biotechnology*, 180, 23-29.
- Hansen, H. G., Pristovšek, N., Kildegård, H. F., & Lee, G. M. (2017). Improving the secretory capacity of Chinese hamster ovary cells by ectopic expression of effector genes: lessons learned and future directions. *Biotechnology advances*, 35(1), 64-76.
- Hong, J. K., Cho, S. M., & Yoon, S. K. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(4), 869-876.
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949.
- Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1400-1410.
- Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 188, 88-96.

- Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., & Bailey, J. E. (1999). Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(5), 573-582.
- Kou, T.-C., Fan, L., Zhou, Y., Ye, Z.-Y., Zhao, L., & Tan, W.-S. (2011). Increasing the productivity of TNFR-Fc in GS-CHO cells at reduced culture temperatures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 136-143.
- Kumar, N., Gammell, P., & Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53(1-3), 33-46.
- Kumar, N., Gammell, P., Meleady, P., Henry, M., & Clynes, M. (2008). Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC biotechnology*, 8(1), 42.
- Kurokawa, H., Park, Y. S., Iijima, S., & Kobayashi, T. (1994). Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(1), 95-103.
- Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., & Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(5), 502-510.
- Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., . . . Hu, W.-S. (2012). Multivariate analysis of cell culture bioprocess data—lactate consumption as process indicator. *Journal of Biotechnology*, 162(2), 210-223.
- Lee, M. S., & Lee, G. M. (2001). Effect of hypoosmotic pressure on cell growth and antibody production in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Cytotechnology*, 36(1-3), 61-69.
- Li, Z., Michael, I. P., Zhou, D., Nagy, A., & Rini, J. M. (2013). Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5004-5009.
- Lu, F., Toh, P. C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, J. (2013). Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 191-205.
- Lu, S., Sun, X., & Zhang, Y. (2005). Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. *Process Biochemistry*, 40(5), 1917-1921. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.004>
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., & Sharfstein, S. T. (2014). Reduced culture temperature differentially affects expression and biophysical properties of monoclonal antibody variants. *Antibodies*, 3(3), 253-271.
- Mears, L., Stocks, S. M., Sin, G., & Gernaey, K. V. (2017). A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *Journal of Biotechnology*, 245, 34-46.
- Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., . . . Kadouri, A. (2006). Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality. *Journal of Biotechnology*, 123(1), 106-116.
- Misaghi, S., Chang, J., & Snedecor, B. (2014). It's time to regulate: Coping with product-induced nongenetic clonal instability in CHO cell lines via regulated protein expression. *Biotechnology Progress*, 30(6), 1432-1440.
- Moore, A., Mercer, J., Dutina, G., Donahue, C. J., Bauer, K. D., Mather, J. P., . . . Ryll, T. (1997). Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*, 23(1-3), 47-54.

- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., . . . Lo, R. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC biotechnology*, 6(1), 43.
- Ochoa, S. (2016). A new approach for finding smooth optimal feeding profiles in fed-batch fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 177-188.
- Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., & Tsumura, H. (2003). Control of temperature and pH enhances human monoclonal antibody production in CHO cell culture *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 169-172): Springer.
- Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., & Tsumura, H. (2006). pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology*, 52(3), 199-207.
- Paredes, C., Prats, E., Cairo, J., Azorin, F., Cornudella, L., & Godia, F. (1999). Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology*, 30(1-3), 85-93.
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3).
- Petch, D., & Butler, M. (1994). Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *Journal of cellular physiology*, 161(1), 71-76.
- Poulain, A., Sylvie, P., Malenfant, F., Allaka, M., Bernard, M., & Yves, D. (2017). Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *Journal of Biotechnology*(255), 16-27.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J., & Miller, L. (1986). Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of immunological methods*, 86(1), 53-59.
- Richelle, A., & Lewis, N. E. (2017). Improvements in protein production in mammalian cells from targeted metabolic engineering. *Current opinion in systems biology*, 6, 1-6.
- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., & Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of cellular physiology*, 220(1), 144-154.
- Robinson, T. A. B. a. D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11 (1), pp 1-13.
- Rouiller, Y., Perilleux, A., Collet, N., Jordan, M., Stettler, M., & Broly, H. (2013). A high-throughput media design approach for high performance mammalian fed-batch cultures. *Mabs*, 5(3), 501-511. doi:10.4161/mabs.23942
- Sauer, P. W., Burky, J. E., Wesson, M. C., Sternard, H. D., & Qu, L. (2000). A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), 585-597.
- Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C., & Hu, W.-S. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing—physiological fundamentals *Cell Culture Engineering* (pp. 119-164): Springer.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013a). The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 162-171.

- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013b). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. *Journal of Biotechnology*, 164(4), 469-478.
- Siegwart, P., Co[^]te, J., Male, K., Luong, J. H., Perrier, M., & Kamen, A. (1999). Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures. *Biotechnology Progress*, 15(4), 608-616.
- Sun, Y.-t., Zhao, L., Ye, Z., Fan, L., Liu, X.-p., & Tan, W.-S. (2013). Development of a fed-batch cultivation for antibody-producing cells based on combined feeding strategy of glucose and galactose. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 126-135.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., . . . Katinger, H. (2006). Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1033-1044.
- Vallée, C., Durocher, Y., & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 169, 63-70.
- Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology Journal*, 10(7), 1051-1066.
- Wlaschin, K. F., & Hu, W.-S. (2006). Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding *Cell Culture Engineering* (pp. 43-74): Springer.
- Wong, D. C. F., Wong, K. T. K., Lee, Y. Y., Morin, P. N., Heng, C. K., & Yap, M. G. S. (2006). Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(2), 373-382.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994). Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1164-1174.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1997). Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells. *Trends in biotechnology*, 15(3), 109-113.
- Xing, Z., Kenty, B., Koyrakh, I., Borys, M., Pan, S.-H., & Li, Z. J. (2011). Optimizing amino acid composition of CHO cell culture media for a fusion protein production. *Process biochemistry*, 46(7), 1423-1429.
- Xing, Z., Li, Z., Chow, V., & Lee, S. S. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnology Progress*, 24(3), 675-683.
- Xu, S., Jiang, R., Mueller, R., Hoesli, N., Kretz, T., Bowers, J., & Chen, H. (2018). Probing lactate metabolism variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology Progress*, 34(3), 756-766. doi:doi:10.1002/btpr.2620
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(4), 370-380.
- Yang, W. C., Minkler, D. F., Kshirsagar, R., Ryll, T., & Huang, Y.-M. (2016). Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity. *Journal of Biotechnology*, 217, 1-11.
- Yoon, S. K., Kim, S. H., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on foreign protein production in recombinant CHO cells *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 163-167): Springer.
- Zhang, F., Sun, X., Yi, X., & Zhang, Y. (2006). Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology*, 51(1), 21-28.

- Zhang, X., Garcia, I. F., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2010). Hyperosmolarity enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology letters*, 32(11), 1587-1592.
- Zhang, Y. (2009). Approaches to optimizing animal cell culture process: substrate metabolism regulation and protein expression improvement *Biotechnology in China I* (pp. 177-215): Springer.
- Zhou, W., Rehm, J., Europa, A., & Hu, W.-S. (1997). Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. *Cytotechnology*, 24(2), 99-108.
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Boom, T. V., & Lee, S. S. (2005). Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnology Progress*, 21(1), 70-77.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3 : PROCESS INTENSIFICATION FOR THE PRODUCTION OF RITUXIMAB BY AN INDUCIBLE CHO CELL LINE

6.1 Présentation de l'article

Dans ce chapitre nous présentons les travaux ayant fait l'objet de l'article 3 intitulé '*Process Intensification for The Production of Rituximab by an Inducible CHO Cell Line*' soumis pour publication dans le journal *Bioprocess and Biosystem Engineering*.

L'étude précédente a démontré que l'élaboration d'une stratégie de culture efficace en mode cuvée-alimentée pouvait conduire à améliorer les rendements de production dans le cas d'inductions effectuées à haute densité cellulaire. Ceci nous a amenés à envisager l'utilisation d'un mode perfusion pour la phase de croissance uniquement, afin de ne pas trop diluer le produit. Dans cette étude, nous avons dans un premier temps évalué l'impact d'effectuer un changement de milieu partiel ou total au moment d'induire les cellules à très haute densité. Une augmentation graduelle de la densité cellulaire et de la concentration en anticorps a été observée en augmentant le pourcentage du volume de milieu remplacé. En flacons, combiner le mode cuvée-alimentée avec des changements de milieu répétés sur une base quotidienne a permis d'augmenter davantage le rendement en produit, mais le pourcentage de galactosylation s'en est trouvé réduit en raison de la durée accrue des cultures. En bioréacteur, une perfusion en continu lors de la phase de croissance jumelée à des ajouts quotidiens d'une solution concentrée en nutriment s'avère procurer le meilleur compromis en termes de rendement et de qualité du produit.

Kahina Mellahi^a, Denis Brochu^b, Michel Gilbert^b, Michel Perrier^a, Sven Ansorge^c, Yves Durocher^c, and Olivier Henry^{a*}

^a Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

^b Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Ottawa, Canada

^c Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address: olivier.henry@polymtl.ca

6.2 Abstract

Mammalian inducible expression systems are increasingly available and offer an attractive platform for the production of recombinant proteins. In this work, we have conducted process development for a cumate-inducible GS-CHO cell line expressing rituximab. To cope with the limitations encountered in batch when inducing at high cell densities, we have explored the use of fed-batch, sequential medium replacements and continuous perfusion strategies applied during the pre-induction (growth) phase to enhance process performance in terms of product yield and quality. In shake flask, a fed-batch mode and a complete medium exchange at the time of induction was shown to significantly increase the integral of viable cell concentration and antibody titers compared to batch culture. Further enhancement of product yield was achieved by combining bolus concentrated feed additions with sequential medium replacement, but product galactosylation was reduced compared to fed-batch mode, as a result of the extended culture duration. In bioreactor, combining continuous perfusion of the basal medium with bolus daily feeding during the pre-induction period and harvesting earlier during the production phase is shown to provide a good trade-off between antibody titer and product galactosylation. Overall, our results demonstrate the importance of selecting a suitable operating mode and harvest time when carrying out high cell density induction in order to balance between culture productivity and product quality.

Keywords: fed-perfusion strategy, perfusion, fed-batch, inducible system, CHO cells, antibody.

6.3 Introduction

Mammalian cell culture remains instrumental for the biomanufacturing of therapeutic proteins (Matthews et al., 2016). Among the mammalian-based expression systems, CHO cells constitute by far the most commonly used platform, due to their ability of producing human-like post-translational modifications (Yusufi et al., 2017). In addition, CHO cells are good candidates for genetic modifications and their great adaptability to different culture media and environmental conditions makes them the host cell line of choice for industrial scale biomanufacturing (Lalonde & Durocher, 2017). The rapid and cost-effective production of active proteins remains a challenge when working with mammalian cells. Process development and optimization efforts typically aim to jointly maximize the cell specific productivity, the maximum cell density and culture duration, or find the best trade-off between these objectives. For a given cell line, this consists in defining optimal process operating conditions, developing an efficient medium formulation, as well as selecting a suitable culture operating mode and feeding protocol.

Due to the typically low product yields and biomass concentrations achieved in simple batch cultures, fed-batch and perfusion processes are the preferred modes for the large-scale biomanufacturing of recombinant proteins (Vallée et al., 2014). The simplicity, scalability and flexibility of operation make fed-batch processes more widely used in industry compared to perfusion mode (Wlaschin & Hu, 2006). Through the implementation of fed-batch strategies, cell growth and cell viability, as well as the productivity of mammalian cells can be significantly improved over batch operation (Wlaschin & Hu, 2006; Wurm, 2004), leading to substantial product titers of over 10 g/L in well optimized-processes (Y. M. Huang et al., 2010). Numerous feeding strategies were developed, usually with the aim to reduce metabolite accumulation by maintaining low but non-limiting nutrient levels (Chee Fung Wong et al., 2005; Kuwae et al., 2005; Sauer et al., 2000; Zhou et al., 1995). Other feeding strategies are based on on-line oxygen uptake rate measurements to adjust the feed rate according to the estimated metabolic activity of cells (Aehle et al., 2011; L. Zhang et al., 2004). On-line biomass (F. Lu et al., 2013) or pH measurements during the cultures have also been used to dictate feed rate adjustments (M. Gagnon et al., 2011). A number of fed-batch strategies simply rely on predefined bolus feed addition to overcome nutrient limitations.

On the other hand, prolonged culture time in fed-batch is often associated with build-up of metabolites in the culture environment, which can be detrimental to cell growth, culture productivity and product quality (Claudia Altamirano et al., 2004; Olivier Henry & Durocher, 2011; Lao & Toth, 1997; Toussaint et al., 2016). Perfusion cultures can be an interesting alternative for protein production, as this mode of operation provides a continuous supply of nutrients and reduces by-products accumulation. This culture operating mode offers several benefits, including a high volumetric output and short product exposure to environmental conditions, thereby minimizing the risk of product degradation/alteration (Y. M. Huang et al., 2010). Furthermore, the perfusion mode can be expected to be even more widely used with the increasing interest toward integrated processes. However, product dilution due to the continuous medium replenishment can sometimes be a concern. For this reason, strategies employing low perfusion rates combined with more concentrated basal medium or nutrient solutions have been proposed (Banik & Heath, 1997; D. Robinson et al., 1995; Jeng-Dar Yang et al., 2000).

During the last decade, there has been a growing interest toward the use of mammalian inducible expression systems (Gaillet et al., 2010; Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017; Z. Sheikholeslami et al., 2014), which open up new challenges and opportunities for cell culture process development. In fact, the ability to decouple the growth from the production phase offer greater flexibility to optimize the process, as specific conditions can be defined for each phase. The common approach for a biphasic culture is then to initially promote cell growth so as to rapidly reach a desired cell density, then trigger the expression and adjust process conditions to favor the product synthesis rate. However, previous studies have demonstrated the importance of the timing of induction, as this culture parameter ultimately influences both the volumetric and the cell specific productivities (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a; Zahra Sheikholeslami, Jolicoeur, & Henry, 2013b). The cells' physiological state and the cellular environment at the time of induction are key determinants of the overall process performance. In batch, culture performance is limited by the inability to perform productive high cell density induction, due to nutrient limitations and/or by-product inhibitions. Unlike for cell lines with constitutive expression, very little work has been devoted specifically to the development of processes using inducible mammalian expression systems.

In this work, we have thus explored the use of different operating modes during the pre-induction phase in an effort to maximize the yield of rituximab produced by an inducible CHO cell line. To

this end, fed-batch, medium exchange, perfusion and hybrid modes were evaluated at small-scale and in bioreactor. Following culture induction and throughout the production phase, a standard fed-batch regime was used so as to limit dilution of the product. The different strategies were compared in terms of product yield, productivity and the resulting product glycan distribution.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Cell line, culture medium and shake flask cultures

A CHOBRI/rcTA- glutamine synthetase stable cell line (Mullick et al., 2006; Poulain et al., 2017) producing an anti-CD20 monoclonal antibody was cultivated in 125 mL shake flasks. Cells were maintained in a Power CHO medium (Lonza, USA) supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) (Sigma Life Science, USA). Batch, fed-batch and perfusion cultures were inoculated at around 0.2x10⁶ cells/mL in BalanCD growth A (Irvine Scientific, USA) medium supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) and 0.3% pluronic F68 (Sigma Aldrich, USA). The shake flasks were incubated at 37°C and agitated at 120 rpm using an orbital shaker in a humidified incubator with 5% CO₂ (Heracell 240i, Thermo Scientific). Cultures were induced with 2 μ g/mL of cumate (Sigma Aldrich, USA) and during the production phase, the temperature was reduced to 34 °C and the agitation was set to 170 rpm. 24h post-induction, 0.05 mg/mL of dextran sulfate (Sigma Life Science, USA) was added to the cultures. A dynamic feeding strategy aiming to maintain glucose at a prescribed set-point (F. Lu et al., 2013) was performed in fed-batch cultures using the commercial concentrated solution IS CHO-CD F12.7 (Irvine Scientific, USA) supplemented with 50 μ M methionine sulfoximine (MSX) and 0.3% of kolliphor (Sigma Aldrich, USA). To mimic perfusion in shake flasks, cultures were performed with sequential discontinuous daily medium exchange using fresh BalanCD media. Samples were harvested daily, centrifuged (2000g, 5 min) and stored at -30 °C for offline analysis.

6.4.2 Bioreactor cultures

Fed-batch, perfusion and fed-perfusion experiments were conducted in a 2L bioreactors with a 0.5L working volume (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland) and a seeding cell density of 0.5x10⁶ cells/mL. The basal medium, concentrated feed solution and dynamic feeding strategy were the same as the ones used in shake flask cultures. Dissolved oxygen was maintained at 50% of air saturation using a mixture of air, oxygen and nitrogen fed by surface aeration at 100 mL/min.

Culture pH was controlled at 7 via CO₂ or base addition. Cultures were started with an agitation speed of 100 rpm and a temperature of 37 °C. During the production phase (post-induction), the temperature was reduced to 34 °C and the agitation speed was increased to 120 rpm to improve the oxygen transfer. For perfusion operation, cell-free culture supernatant was withdrawn continuously using a Flownamics FISP® sampling probe with a ceramic membrane pore size of 0.2 µm immersed into the culture medium (Figure 6.1). The perfusion rate was started on day one and continued until the time of induction. Daily bolus additions of the concentrated feed solution were used during the production phase in all the cultures.

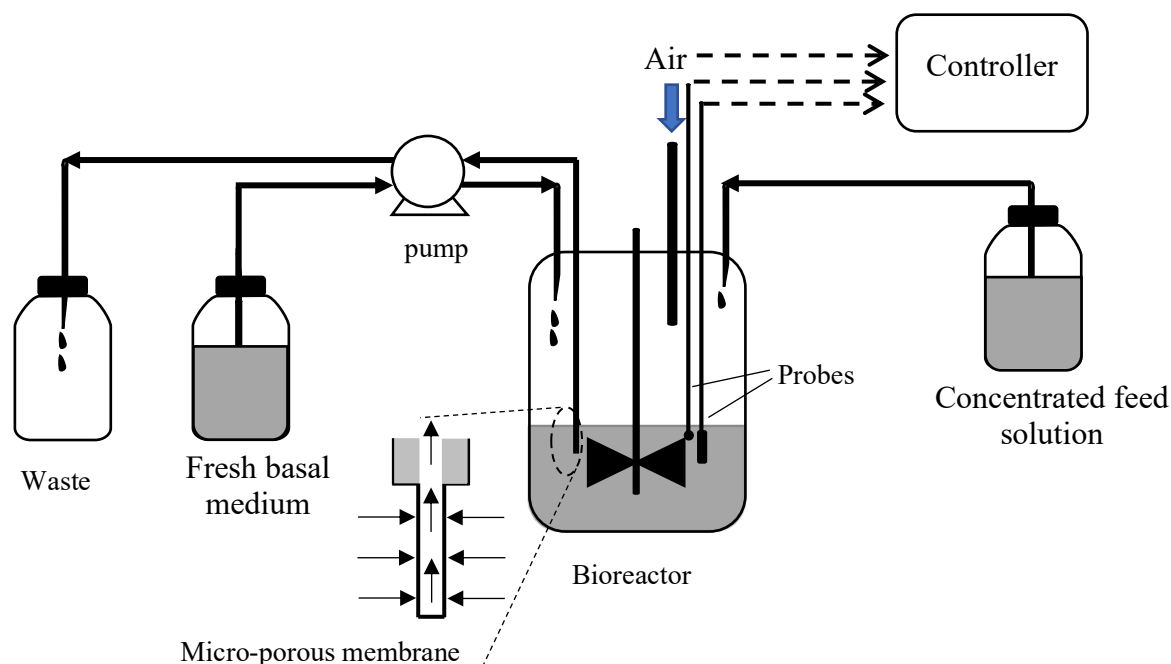


Figure 6.1 : Schematic illustration of the culture system with continuous perfusion of basal medium and daily bolus additions of a concentrated feed solution

6.4.3 Viable cell, nutrient, metabolite and product analysis

Cell counting and cell viability were determined by trypan blue exclusion method. Glucose and lactate concentrations were measured with a YSI 2700 biochemistry analyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH). Ammonia concentrations were determined using an enzymatic assay kit (AA0100-1KT, Sigma-Aldrich). Antibody concentration was determined by a quantitative HPLC (WATERS Corporation, Milford, MA) employing a protein A cartridge (POROS® A20 column,

2.1 mmD x 30 mmH, 104 uL, Invitrogen, Grand Island, NY) as described in Toussaint et al. (Toussaint et al., 2016).

6.4.4 Glycan distribution analysis

For glycan distribution analysis of the product, culture supernatants were purified with a protein A chromatography on an Akta explorer system (GE Healthcare, Baie-d'Urfé, QC). Samples were filtered and mixed to the loading buffer solution, before injection at 1.5 mL/min in a protein A column that was firstly equilibrated (ESHMUNO[®], MiniChrom column, Eshmuno[®] A, 1 mL, Merck). The antibody was eluted at pH 4 using the same flow rate. A buffer-exchange step against water was then performed using Amicon ultra 4, 3K falcons (Millipore). Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) was used to assess the glycan distribution. The N-linked glycans were released using the Rapid PNGaseF (Catalog #P0710S, New England Biolabs) two-step protocol, according to the manufacturer's instructions. The free glycans were then labeled with 2-aminobenzamide (2-AB) prior to injection on a TSKgel Amide-80 column. Ammonium formate 100 mM at pH 4.5 (Solvent A) and acetonitrile 100% (Solvent B) were used for the elution step. Peak areas were used to determine the relative abundances after calibrating the fluorescence chromatogram with a 2-AB dextran ladder (Waters 186006841) and compared to GU values in glycostore.org/collections.

6.5 Results

6.5.1 Small-scale batch and fed-batch cultures with medium exchange at induction

To assess how the nutrient availability at the time of induction influences antibody production, small-scale batch and fed-batch cultures were carried out with complete or partial medium exchange at the time of induction, corresponding to cell densities of $8\text{-}10 \times 10^6$ cells/mL. To this end, varying amounts of culture medium were removed from the flasks (from 0% to 100% of the culture volume), centrifuged and cells were re-suspended in the corresponding amounts of fresh basal media. For batch cultures, induction was performed on day 5 and all the cultures with an exchange rate of 50 % and more exhibited cell growth post-induction. A maximum cell density of 13×10^6 cells/mL was achieved in the batch cultures with complete medium replacement at

induction (Figure 6.2). This significant improvement may be due to either nutrient replenishment, waste metabolite dilution, or both. Cell viability was maintained above 80% for 8 days in the cultures with 75% and 100% medium exchange, while an earlier decline was observed on day 6 for the control cultures without medium exchange. The time-profiles of glucose concentration were relatively similar in the cultures with 0 or 25 % medium exchange (Figure 6.3A). However, increasing the culture medium renewal led to a slight accumulation of glucose immediately post-induction. In all the batch experiments, lactate accumulated in the culture environment up until day 4, reaching a maximum concentration of 10 mM. Lactate was then consumed prior to the induction and medium exchange. Interestingly, the lactate levels one day post-induction were fairly similar in cultures with no, partial or complete medium exchange. This indicates that, whereas consumption of this metabolite continued in the control cultures immediately post-induction, lactate was significantly produced during the 24h post-induction in the cultures with complete medium exchange. The other major by-product was ammonia and its final concentration at harvest was significantly reduced (1.7-fold) in the cultures with complete medium exchange compared to the control without culture dilution at induction (1.3 mM vs 2.2 mM, respectively).

Table 6.1 : Cell culture kinetics in shake flask batch cultures with different medium exchange volumes at induction. Values are mean \pm SD from duplicated cultures.

	Percentage of medium exchange at induction				
	0%	25%	50%	75%	100%
μ . (d ⁻¹)	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
X_{\max} (10 ⁶ cells/mL)	9.5 \pm 0.9	9.7 \pm 0.3	11.4 \pm 0.7	12.1 \pm 0.2	12.9 \pm 0.2
IVCC (10 ⁶ cells.d/mL)	25 \pm 3	31 \pm 3	43 \pm 7	53 \pm 3	58 \pm 4
q_p^{avg} (pg/cell.d)	5.5 \pm 0.8	6.1 \pm 0.8	6.7 \pm 1.2	6.1 \pm 0.4	5.5 \pm 0.4
Culture duration (d)	8	8	10	10	10

Table 6.2 : Cell specific rates in shake flask fed-batch cultures with different medium exchange volume. Values are mean \pm SD from duplicated measurements

	Percentage of medium exchange at induction				
	0%	25%	50%	75%	100%
μ . (d^{-1})	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2
X_{max} (10^6 cells/mL)	11.8 ± 0.2	11.9 ± 0.4	14.8 ± 0.3	15.4 ± 0.7	16.3 ± 0.4
IVCC (10^6 cells.d/mL)	85 ± 23	106 ± 5	104 ± 11	121 ± 8	125 ± 10
q_P^{avg} (pg/cell.d)	9.4 ± 2.6	10.4 ± 0.5	10.7 ± 1.2	9.6 ± 0.7	11.6 ± 0.9
Culture duration (d)	15	18	18	19	20

The antibody concentration measured at culture harvest was significantly impacted by nutrient replenishment (Figure 6.3F). The maximum antibody concentration achieved was 320 mg/L in batch cultures with complete medium renewal, a 2.3-fold increase compared to the cultures without medium exchange. The increase in product titer was mainly due to an augmentation in the integral of viable cell density, since the cell specific productivity remained in the range of 5.5 to 6.7 pg/cell.d for all the batch cultures (Table 6.1).

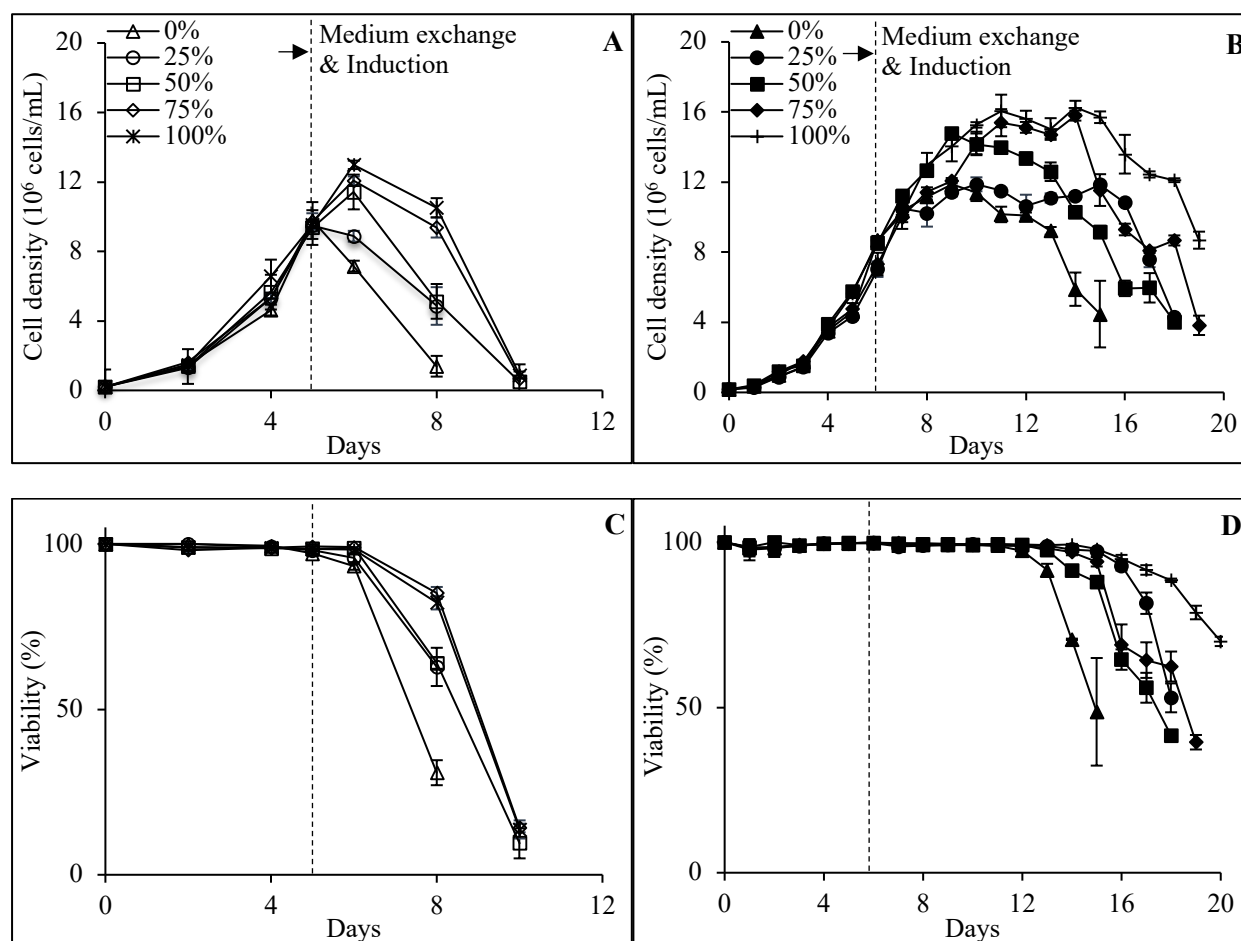


Figure 6.2 : Time profiles of viable cell density and cell viability in batch (A, C) and fed-batch cultures (B, D) performed with different proportions of medium exchange at the time of induction: 0% (triangle), 25% (circle), 50% (square), 75% (diamond) and 100% (cross). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch cultures. Dashed lines indicate the time at which medium exchange, culture induction and temperature switch to mild hypothermia were concomitantly performed. Error bars depict SD from duplicate cultures.

To assess whether cellular growth and productivity could be further improved, shake flask fed-batch cultures were carried out using a commercial concentrated feed solution. Daily bolus additions were made during the growth and production phases. As in the batch cultures, different percentages of medium exchange using the basal medium formulation were performed at the time of induction. As shown in Figure 6.2B, cells were cultured until day 6, before performing the

medium exchange and culture induction. As expected, the overall culture duration was significantly prolonged with the fed-batch mode compared to batch cultivation. The average cell specific growth rate was consistent across all fed-batch cultures (0.6 d^{-1}) and the growth phase was extended by at least 3 days compared to batch. Overall, the integral of viable cell concentration (IVCC) was 1.5 to 2.2-fold higher compared to batch cultures with complete medium exchange at induction. The maximum cell density ($16 \times 10^6 \text{ cells/mL}$) was achieved in the fed-batch with complete medium exchange and cell viability was maintained above 80% during 19 days. In contrast, viability started to drop around day 13 for the fed-batch cultures without medium renewal. In all the fed-batch cultures, we observed lactate accumulation during the first 5 days up to a maximum concentration of 11 mM. Then, similar to batch, a change in lactate metabolism occurred one day before the medium exchange and culture induction. Lactate was then diluted at different levels as a result of the different medium exchange rates, and a short temporary reproduction phase was observed in some cultures until day 8, followed by a consumption phase afterwards. The fed-batch cultures with complete medium replacement presented the highest final ammonia concentration (5 mM), due to the larger quantity of concentrated feed solution added to support the higher cell density.

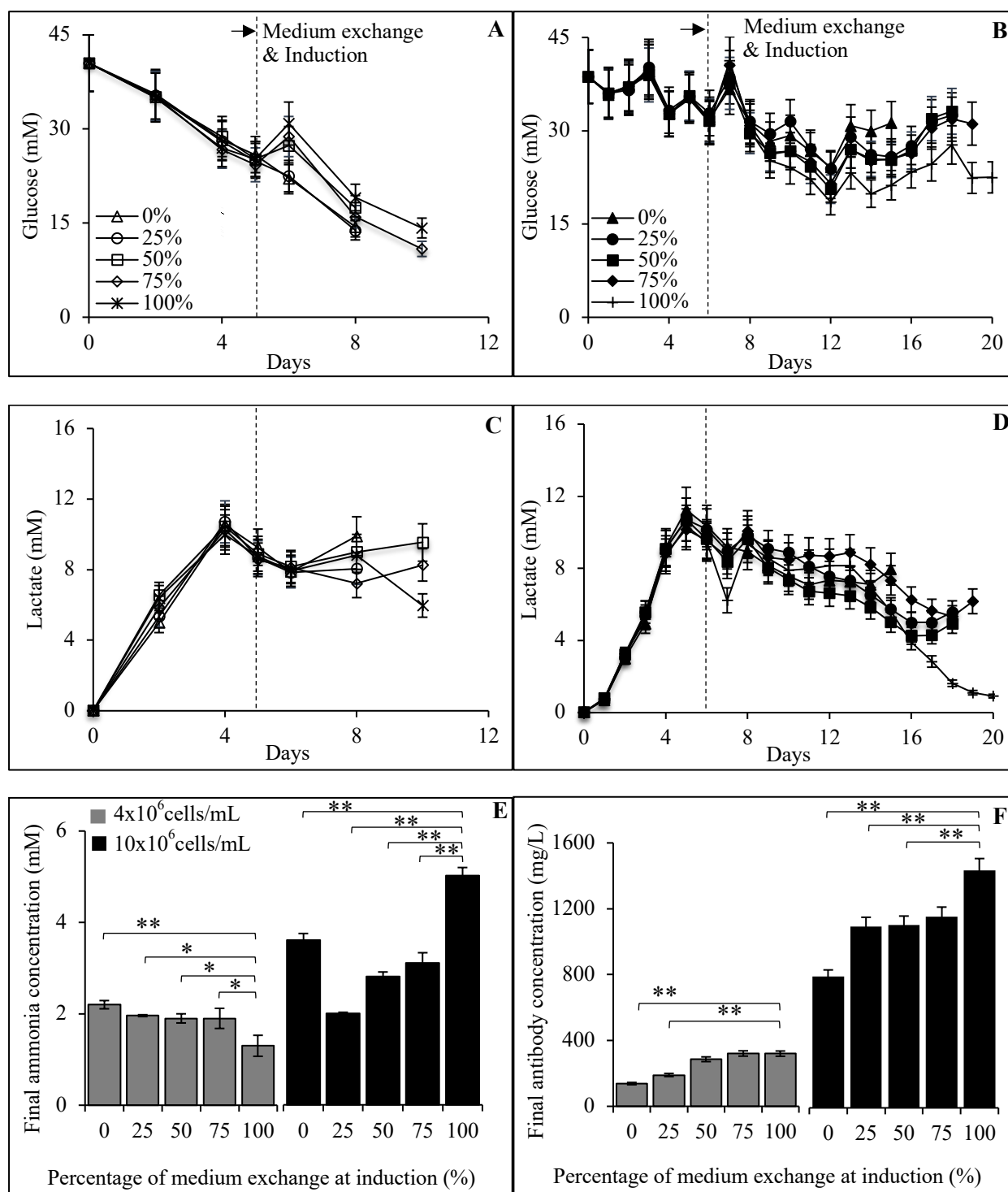


Figure 6.3 : Glucose and lactate concentrations in batch (A & C) and fed-batch cultures (B& D). Medium exchanges were performed by replacing increasing fractions of the culture volume with fresh media: 0% (triangle), 25% (circle), 50% (square), 75% (diamond) and 100% (cross). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Final ammonia concentrations (E) and final monoclonal antibody production (F) for batch (grey bars) and fed-batch cultures (black bars). Dashed lines indicate the time at which medium exchange, culture induction and temperature switch to mild hypothermia were concomitantly performed. Error bars depict SD from duplicate cultures.

Irrespective of the percentage of medium exchange, antibody production was always significantly higher in fed-batch cultures (Figure 6.3F). The highest product titer was achieved with the full medium exchange at induction, a 1.8-fold improvement compared to the fed-batch control and at least a 4.5-fold increase compared to batch cultures. Furthermore, the overall cell specific productivity increased from 9 to 11.6 pg/cell.d (Table 6.2) as the percentage of medium exchanged increased.

6.5.2 Small-scale cultures with different pre-induction feeding strategies

The previous results demonstrated the critical impact of the concentrated feed additions on product titers, but also the beneficial effect of a single medium exchange performed at induction. This prompted the evaluation of conducting repeated medium exchanges on a daily basis, so as to mimic perfusion operation in shake flasks (O. Henry, Kwok, & Piret, 2008). We have thus compared the use of three distinct feeding regimes applied during the growth phase: i) cultures operated with daily bolus feeding of a concentrated nutrient solution (referred to as ‘fed-batch’) ii) cultures operated with a discontinuous daily medium exchange rate of 20 % (referred to as ‘perfusion’) and iii) cultures combining the two previous modes (referred to as ‘fed-perfusion’). In all the cultures, the production phase post-induction was performed under a fed-batch mode so as to reduce product dilution. The daily medium exchange rate of 20 % was set so as to maintain operational simplicity (i.e. reduce volume handling) at both shake flask and bioreactor scales.

Table 6.3 : Feeding strategies employed during shake flask cultures

	Pre-induction phase	Post-induction phase
Fed-batch (control)	Dynamic feeding of a concentrated nutrient solution	Dynamic feeding of a concentrated nutrient solution
Low perfusion	Discontinuous 20 % medium exchange per day	Dynamic feeding of a concentrated nutrient solution
Fed-perfusion	Discontinuous 20 % medium exchange per day + dynamic feeding of a concentrated nutrient solution	Dynamic feeding of a concentrated nutrient solution

The fed-perfusion strategy led to a significant enhancement in maximum viable cell density (19×10^6 cells/mL) compared to the control fed-batch cultures (11×10^6 cells/mL). The cultures performed with repeated medium exchanges reached an intermediate value of 15×10^6 cells/mL. Compared to the fed-batch mode, culture duration was extended from 15 to 18 days in the perfusion and the fed-perfusion cultures (Figure 6.4A and 6.4B). The cell specific growth rate was relatively similar (0.5 to 0.6 d^{-1}), but the fed-perfusion cultures exhibited a prolonged exponential phase up to 48h post-induction. Glucose concentrations were maintained over 30 mM in the cultures fed with the concentrated nutrient solutions, whereas it decreased to 20 mM during the growth phase of the perfusion cultures. This was only temporary as subsequent concentrated feed additions performed during the post-induction phase raised the glucose concentration to the prescribed set-point of around 30 mM. The lactate time-concentration profiles (Figure 6.4D) were initially very similar during the growth phase, reaching a maximum concentration of 11 mM on day 4 for both the fed-batch and perfusion cultures, while the fed-perfusion attained a maximum of 13 mM one day after. Lactate was then consumed by the cells during the production phase, until near depletion in the perfusion and fed-perfusion cultures, which reached higher cell densities and yielded greater IVCC. The switch in lactate metabolism occurred around days 5-6, whether the cells were still exponentially growing (fed-perfusion cultures) or entering the stationary phase (fed-batch cultures). The final ammonia concentration was 2.9 mM in fed-batch, and this value increased to 4 mM and nearly 6 mM in the perfusion and fed-perfusion cultures, due to the extended culture durations and greater IVCC achieved. The highest antibody concentration was obtained in the fed-perfusion cultures (1.5 g/L), representing 1.7-fold and 1.1-fold improvements over the final titers attained in the fed-batch and perfusion cultures, respectively. However, the average cell specific

productivities were relatively the same (Table 6.1) and the increased antibody concentration of the fed-perfusion cultures was mainly due to the increased IVCC.

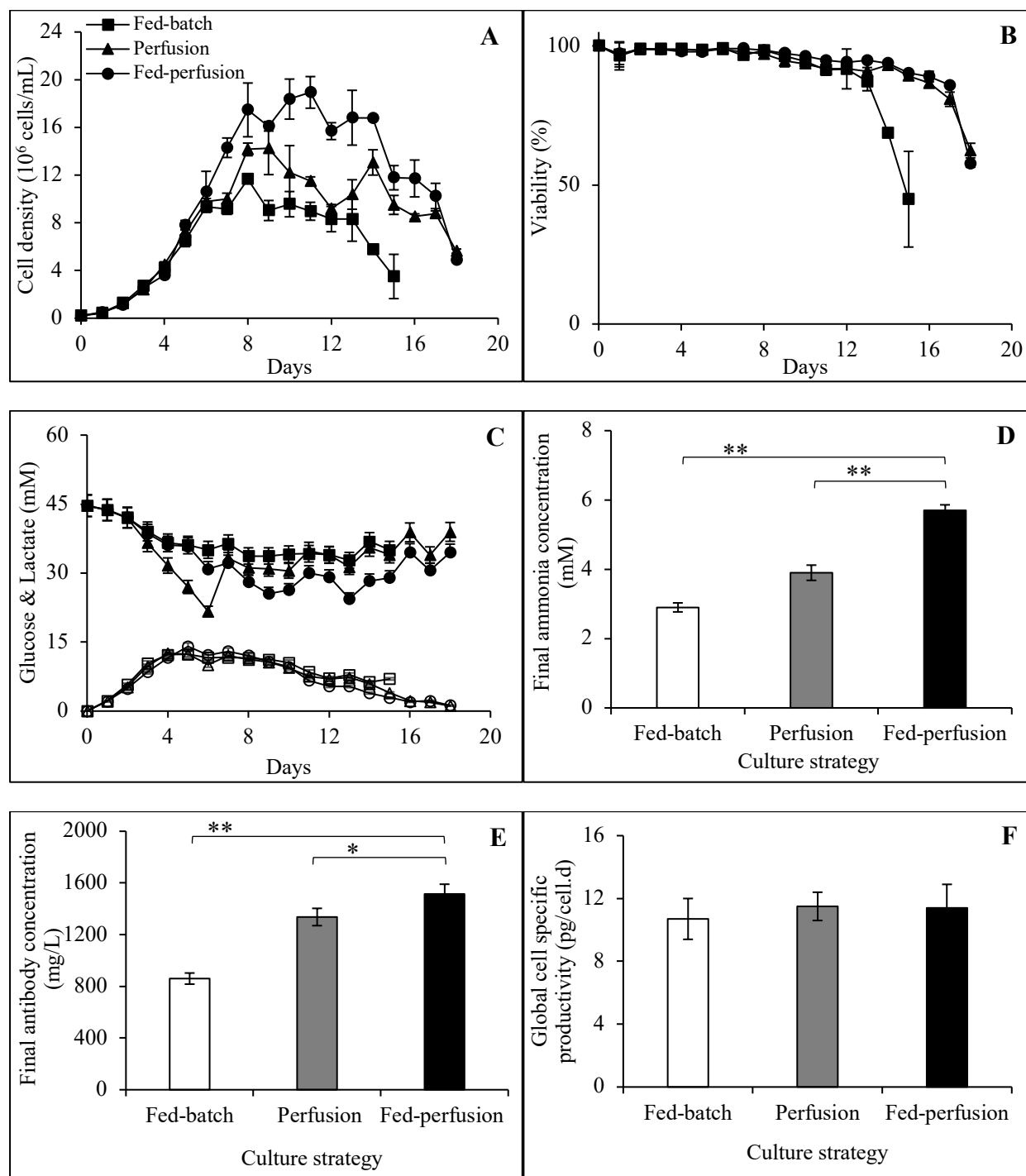


Figure 6.4 : Cell concentration (A), cell viability (B), glucose (C) and lactate (D) concentration profiles, final ammonia (E) and final antibody (F) concentrations in shake flask cultures operated

with different feeding regimes: fed-batch cultures (squares and white bars), perfusion cultures (triangles and grey bars) and fed-perfusion cultures (circles and black bars). The arrow indicates the time of induction. Errors depict standard deviation of duplicate experiments.

6.5.3 Product glycan distribution in shake flask cultures

Samples collected at harvest from the shake flask cultures were analyzed by HILIC in order to assess how the different feeding regimes impacted the product glycan distribution (Figure 6.5). Fucosylated non-galactosylated (G0F), Fucosylated mono-galactosylated (G1F) and fucosylated di-galactosylated (G2F) glycans were the most abundant species observed in all our samples. The glycan distributions reveal that the fraction of galactosylated species at harvest was reduced in the perfusion and the fed-perfusion cultures, presumably due to the extended duration of these cultures and the adverse environmental conditions associated with low cell viability. The reduced availability of galactosylation precursors in these high cell density cultures could also explain the observed differences. Irrespective of the production mode, the product was highly fucosylated while the level of sialylation was fairly low.

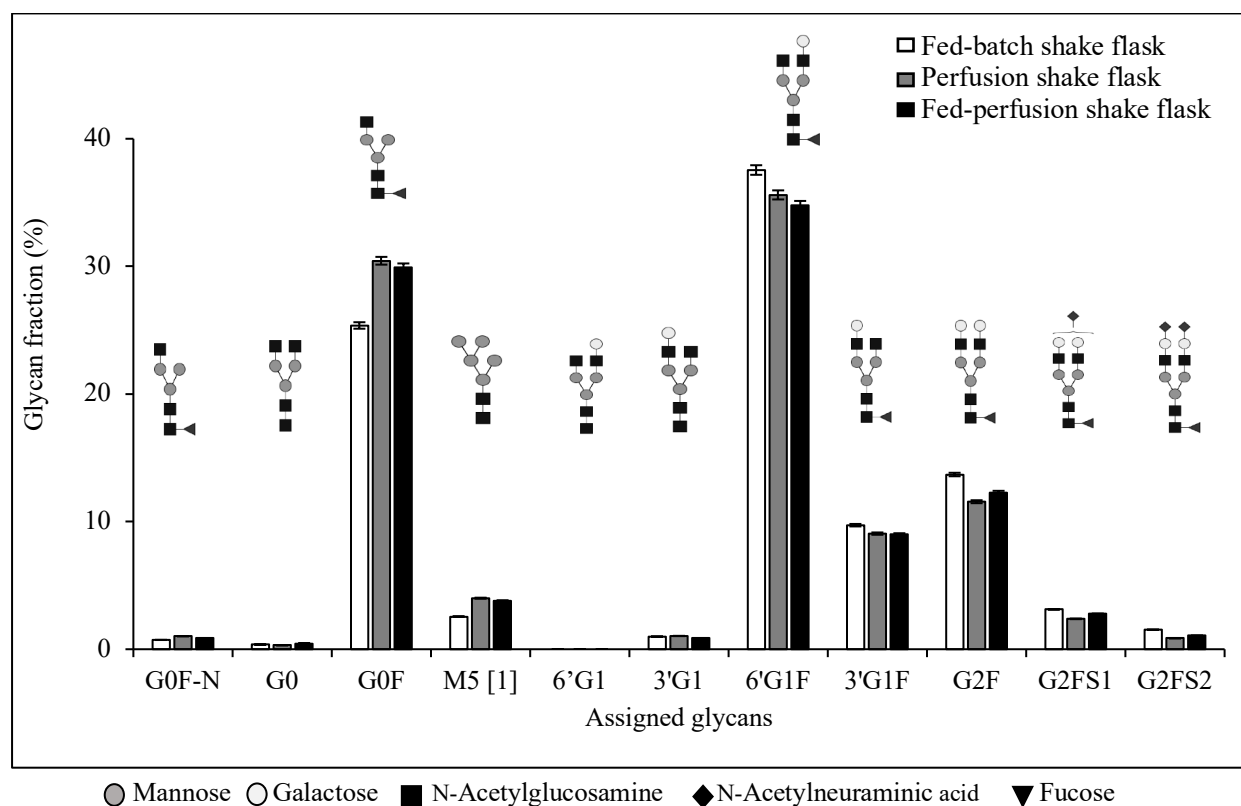


Figure 6.5 : Glycan profiles in shake flask cultures. HILIC analysis was performed on samples at harvest days which correspond to 9, 12, 12 dpi for respectively fed-batch (white bar), perfusion (grey bar) and fed-perfusion (black bar) cultures.

6.5.4 Bioreactor cultures with different pre-induction feeding strategies

The same feeding regimes tested at small-scale were applied to controlled cultures performed in a 2L bioreactor system and the results are shown in Figure 6.6. Whereas daily discontinuous medium exchanges were performed in shake flasks, continuous perfusion was carried out in bioreactor using a ceramic filter to withdraw cell-free culture supernatant and replace it by fresh basal medium (BalanCD growth A) at a rate of 0.2 vvd (volume of fresh medium/working volume of reactor/day). No bleed rate was necessary and the perfusion rate was maintained until culture induction at a cell density of 10×10^6 cells/mL. As observed in shake flasks, combining daily concentrated feed additions with a perfusion rate led to significant cell growth post-induction; the fed-perfusion culture reached a maximum cell density of 17×10^6 cells/mL on day 7. In comparison, the maximum cell concentrations were around 11×10^6 cells/mL for the fed-batch and perfusion cultures. High cell viability was also maintained for a longer period of time in the fed-perfusion bioreactor (Figure 6.6B), so the IVCC for this culture was significantly higher compared to the other operating modes. The initial lactate accumulation was also more pronounced in this culture, reaching a maximum of 19 mM (compared to 17 and 14 mM for the perfusion and fed-batch, respectively), but this metabolite was also consumed more rapidly during the production phase (Figure 6.6C). In contrast, lactate concentration remained high and relatively steady from day 4 to day 13 in the perfusion culture. The final ammonia concentrations measured at harvest were 2-fold higher in the fed-batch and fed-perfusion cultures, indicating that the accumulation of this metabolite is mostly associated with the bolus additions of the concentrated feed solution.

The antibody concentrations measured at different time-points during the three bioreactor runs are shown in Figure 6.6E. The maximum product titers were relatively similar across the three modes (1.2-1.3 g/L). The slight reductions observed in antibody titers at harvest for the perfusion and fed-perfusion cultures were due to product dilution resulting from the concentrated feed additions. Of interest, the antibody concentration measured in the fed-perfusion culture on day 11 was already

1.1 g/L (83 % of the maximum concentration achieved on day 16), which was considerably higher than the corresponding concentrations measured in the other bioreactors (0.6 – 0.7 g/L). During the production phase, the cell specific productivity was comparable in the three culture modes (8 – 10 pg/cell.d) on day 11.

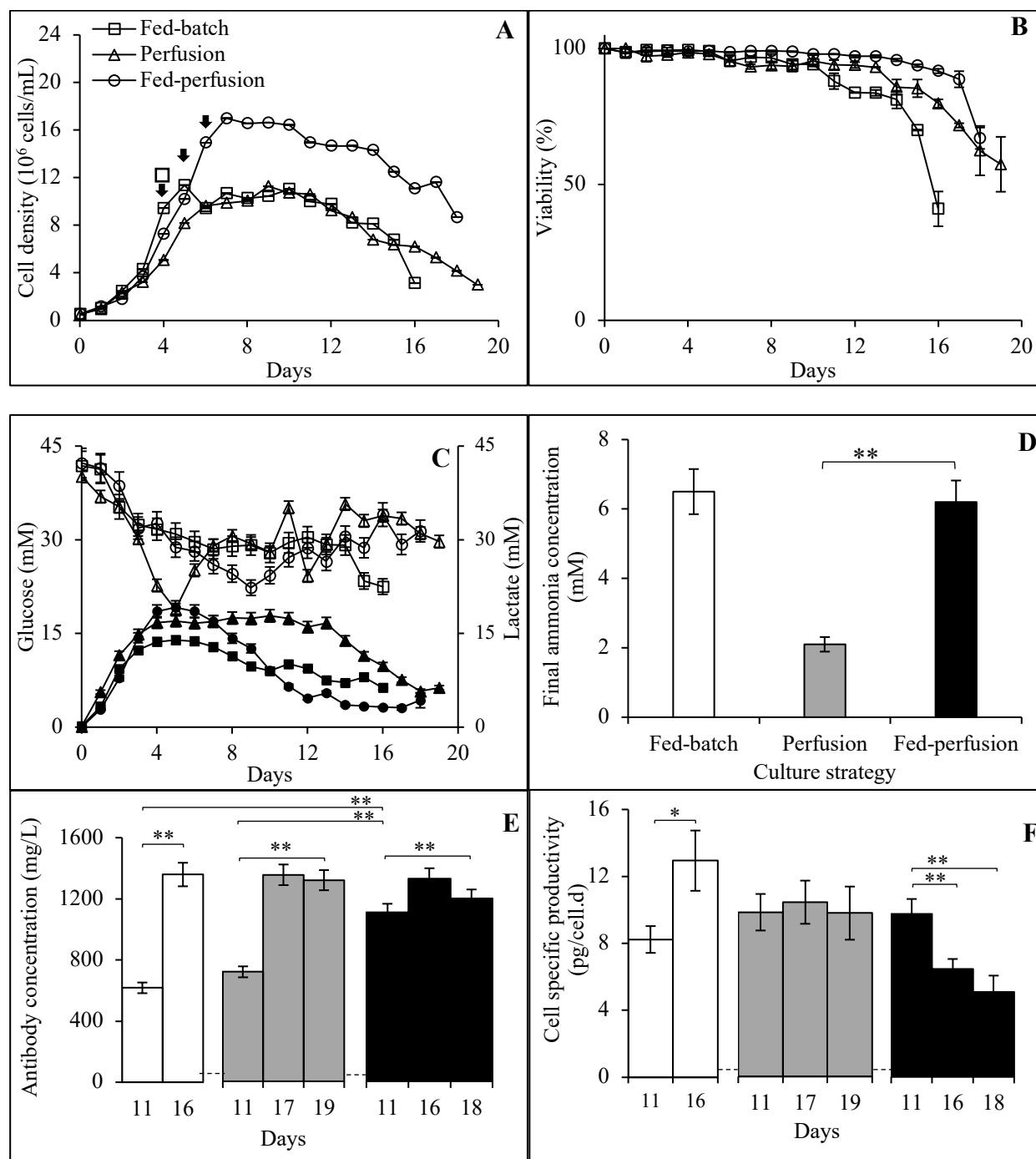


Figure 6.6 : Cell concentration (A), cell viability (B), glucose and lactate (C) concentration profiles, final ammonia concentration (D) antibody concentration (E) and cell specific productivity (F) in bioreactor cultures operated with different feeding regimes: fed-batch cultures (squares and white bars), perfusion cultures (triangles and grey bars) and fed-perfusion cultures (circles and black bars). The arrow indicates the time of induction. Errors depict standard deviation of duplicate experiments.

Beyond this point, the specific productivity was found to decrease rapidly in the fed-perfusion culture, as a result of the increased IVCC and the relatively constant product titer. In striking contrast, the fed-batch culture experienced a significant increase in the overall cell specific productivity (13 pg/cell.d). Overall, the better-controlled conditions in bioreactor were beneficial for the fed-batch mode, as both the IVCC and the final antibody concentration were enhanced by 20 % and 60 %, respectively, compared to the corresponding shake flask fed-batch cultures. The maximum product titers were comparable at small-scale and in bioreactor for the perfusion cultures, and were marginally lower (~10 %) for the fed-perfusion mode.

6.5.5 Glycan distribution in bioreactor cultures

The glycan profiles corresponding to samples collected from bioreactor cultures are presented in Figure 6.7. To assess the impact of culture duration, samples collected at two different time points of each culture were analyzed; the first sample corresponds to high cell viability conditions (day 11) while the second sample was collected at culture harvest (days 16, 19 and 18 for the fed-batch, perfusion and fed-perfusion cultures, respectively) when the cell viability dropped below 60 %. Under good cell viability conditions, the fed-perfusion culture displayed the lowest percentage of a-galactosylated glycans (23 %) compared to the fed-batch (29 %) and perfusion (32 %) cultures. The fraction of a-galactosylated glycoforms was found to increase over time in the perfusion and fed-perfusion cultures. In contrast, the percentage of galactosylation did not vary significantly with time in the fed-batch mode. As a result, the fed-perfusion and the fed-batch cultures exhibited relatively similar glycan distributions at harvest. As observed in shake flasks, product sialylation remained low (<5%), whereas the percentage of fucosylation was always maintained between 90 to 95 %. Although pH and DO levels are factors that can potentially impact product glycosylation,

overall, the small-scale cultures were generally representative of the bioreactor runs in terms of glycan distribution when considering the harvest point.

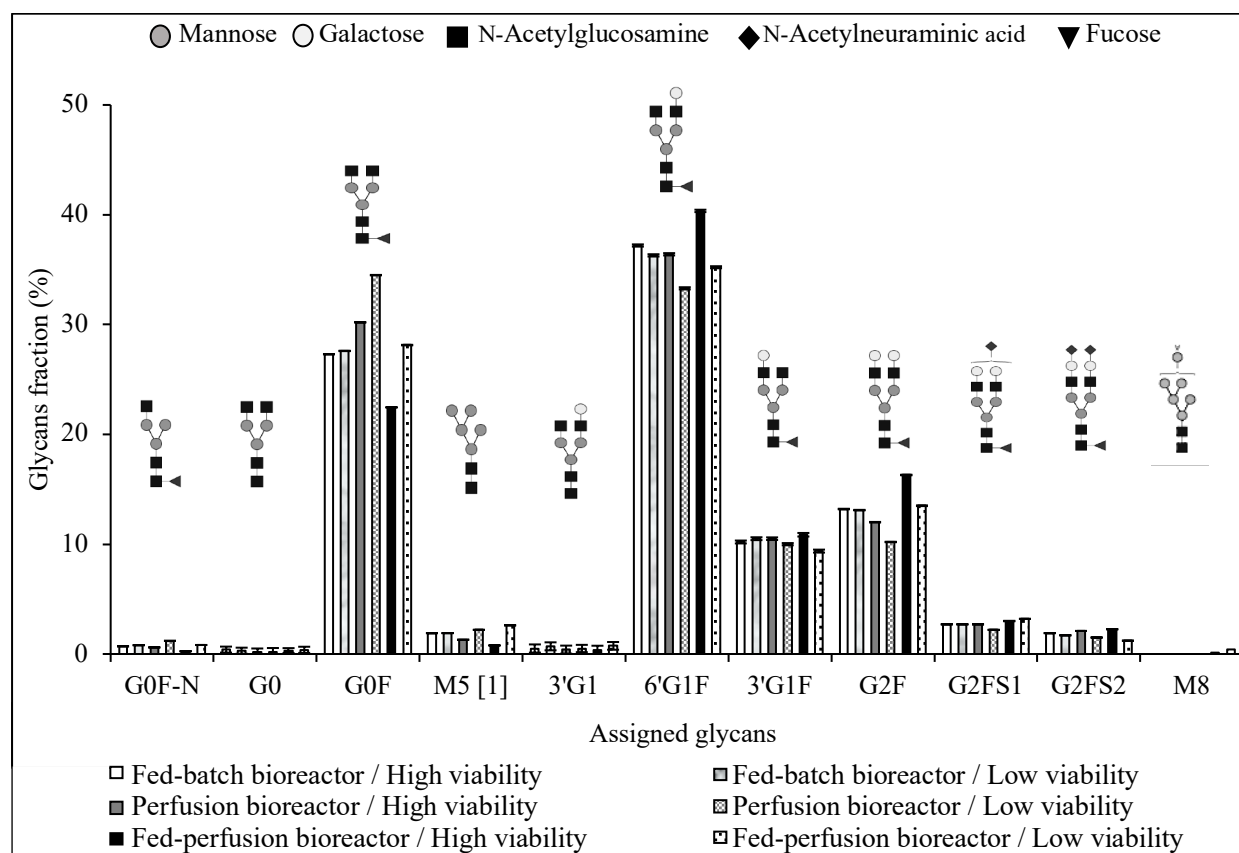


Figure 6.7 : Glycan distribution in bioreactor cultures operated with different feeding regime during the production phase: fed-batch, perfusion and fed-perfusion cultures. For each bioreactor, samples were collected on day 11 under high cell viability conditions and at culture harvest (day 16, 18 and 19 for fed-batch, low rate perfusion and fed-perfusion, respectively).

6.6 Discussion

Fed-batch and, to a lesser extent, perfusion remain the predominant modes of operation for industrial large-scale biomanufacturing of recombinant monoclonal antibodies (Y. M. Huang et al., 2010; S.-Y. Lee et al., 2012). Choosing between fed-batch and perfusion modes depends on several

factors, such as the stability of the cell line and product, process scalability, volumetric productivity, capital investment, development time and process operating costs. The fed-batch mode retains the simplicity and ease of scalability of batch cultures. Perfusion operation offers the possibility to provide nutrients simultaneously with removing inhibitory compounds, as well as remove the secreted product from the bioreactor to minimize the exposure to degradative enzymes. Perfusion rates typically vary between one to three reactor volume per day (Voisard et al., 2003). While high perfusion rates can allow to achieve and maintain high cell densities, they also lead to low product titers due to continuous dilution and are more challenging in terms of liquid handling. Nonetheless, the perfusion mode can offer a reduced footprint and shorter production cycle time, as well as much greater volumetric productivity compared to fed-batch (Meuwly et al., 2006), but process complexity and scalability are still perceived as major limitations, mainly due to the cell retention apparatus.

Further process intensification efforts have also led to the development of hybrid culture operating modes that integrate the advantages of both fed-batch and perfusion, such as “concentrated fed-batch” (whereby the culture is perfused, but product is retained in the vessel)(J. Bonham-Carter, Weegar, Nieminen, Shevitz, & Eliezer, 2011; W. C. Yang, D. F. Minkler, R. Kshirsagar, T. Ryll, & Y. M. Huang, 2016) or “fed-perfusion” cultures (combining perfusion operation to keep by-products at low levels and nutrient feeding to avoid limitations) (Q. Feng et al., 2006; G. W. Hiller, A. M. Ovalle, M. P. Gagnon, M. L. Curran, & W. Wang, 2017; J. D. Yang, Y. Angelillo, M. Chaudhry, C. Goldenberg, & D. M. Goldenberg, 2000). Hiller and al. (G. W. Hiller et al., 2017) increased the productivity of five CHO clones expressing different humanized antibodies using a two-stages cultivation strategy; cells were initially perfused to allow fast expansion and then a conventional fed-batch was applied using a concentrated nutrients solution. By using a similar controlled fed-perfusion strategy, Teng et al. (Teng et al., 2011) have successfully kept toxic by-products below their inhibitory concentrations and achieved a 2-fold improvement in product yield compared to a perfusion process. Using a controlled fed-perfusion process, Yang et al. (J. D. Yang et al., 2000) also achieved a two-fold improvement in terms of volumetric productivity over perfusion, due to the combined effect of higher cell density and lower product dilution. Of interest, these hybrid modes can use the same purification process designed for legacy fed-batch processes (G. W. Hiller et al., 2017).

These operating strategies were used for cell culture processes employing mammalian cell lines with constitutive expression. In this work, we have explored the use of a hybrid process for an inducible CHO-GS cell line to enhance process performance. Inducible expression systems confer the flexibility to trigger the onset of protein production at a desired moment. For maximizing the expression of cytotoxic or cytostatic proteins, it is normally required to initially grow the cells until a sufficient cell density is reached before inducing the production. Since heterologous protein expression in general is a process that necessitates the mobilization of substantial cellular resources (e.g. energy, biosynthesis precursors), inducible expression systems are also advantageous in that the growth and production phases can be uncoupled. For many cell lines, the cell specific productivity is higher when cells are not in an active growing state (Gregory W Hiller et al., 2017; Sunley & Butler, 2010; Yoon, Kim, et al., 2003). For an inducible system, this would suggest to initially grow the cells rapidly until reaching a high cell density before adding the inducer to trigger the expression. However, previous works have reported the significant impact of the timing of induction and culture environment on the resulting volumetric productivity for such systems (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a, 2013b). More specifically, in batch cultivation, a reduction in cell specific productivity was observed as the cell density at induction was increased, due to nutrient limitation and/or waste metabolite accumulation.

In this study, our goal was to identify a feeding strategy for the growth phase that could support productive high cell density induction. Culture induction was thus performed when the cell density reached around 8 to 10x10⁶ cells/mL, corresponding to the late-exponential phase for un-induced cells grown in batch with the same basal medium. First, we explored the impact of performing a partial or full medium exchange at the time of induction when cells were grown in either batch or fed-batch cultures. Medium exchange is commonly employed at small-scale to sustain higher cell density and achieve higher culture productivity (Ozturk, 1996). While increasing the percentage of medium replacement at induction always led to higher product titers in batch and fed-batch, the greatest impact on volumetric productivity was related to the daily addition of a concentrated nutrient solution during the pre-induction phase. This tends to suggest that nutrient availability is the prime factor limiting high cell density induction in batch cultures. A fed-batch without medium exchange led to a 2-fold improvement in product titer compared to a batch culture with full medium replacement. When a full medium exchange was combined with a fed-batch mode (applied before and after induction), the product yield was further nearly doubled in shake flask cultures. The

increased product titers were due to significant enhancements in terms of maximum cell density, culture duration and cell specific productivity compared to batch.

We then assessed the use of performing daily medium replacement of the basal medium during the growth phase, still followed by a fed-batch mode during the production phase. Sequential medium replacements are typically used to mimic perfusion conditions at small scale (O. Henry et al., 2008). In shake flask, this mode of operation increased the product yield 1.7-fold compared to fed-batch mode. Combining sequential medium replacements with bolus concentrated feed additions (fed-perfusion) further improved culture performance but the increase was small (1.8-fold enhancement over fed-batch) compared to daily medium exchange alone. This would suggest that waste by-products accumulation is limiting high-induction fed-batch cultures, or that the basal medium is replenishing key nutrients that are not contained in the concentrated feed solutions. Whereas fed-batch was shown to improve the cell specific productivity compared to batch, all the cultures fed during the growth phase (fed-batch, perfusion, fed-perfusion) exhibited similar productivities and the yield enhancements were thus achieved via an increase in the IVCC. When the same feeding regimes were applied in bioreactor, the differences among the culture modes vanished when considering the final antibody concentrations at harvest. The fed-batch bioreactor culture exhibited increased IVCC (23 %) and cell specific productivity (29 %) compared to shake flasks operated with the same feeding protocol. This could have been attributed to the better controlled conditions but, surprisingly, we did not observe the same enhancements for the perfusion and fed-perfusion bioreactor cultures. Nonetheless, the fed-perfusion mode had a distinctive benefit in that high product titers were reached sooner compared to the other two modes.

It is well known that metabolite accumulation can have a negative effect on culture performance. Growth-inhibiting effects of lactate are typically reported for concentrations (>40 mM) much higher than the ones encountered in our cultures; the maximum lactate concentration we observed was 20 mM in the fed-perfusion bioreactor. Furthermore, lactate was always consumed during the production phase, albeit at varying rates. Ammonia concentrations in the range of 5-8 mM and above have also been reported to inhibit growth and reduce protein production (Pereira et al., 2018; Jeng-Dar Yang et al., 2000; Yang & Butler, 2000). In the present study, the highest ammonia concentrations (6 mM) were observed when cultures were simultaneously perfused with the basal medium and fed with a concentrated nutrient solution. Much lower final concentrations were

achieved with a perfusion strategy in shake flask and bioreactor (2-4 mM), but with no apparent beneficial impact on growth and productivity. Since we employed a GS CHO cell line, this contributed to mitigate ammonia accumulation in the culture environment (S. M. Noh, Shin, & Lee, 2018). Different proliferation control strategies have been proposed to achieve improved culture longevity and enhanced productivity. These include temperature shift to conditions of mild hypothermia, the use of chemical agents for cell cycle arrest and cell engineering-based approach to inhibit apoptosis (Y. M. Huang et al., 2010). In our work, the temperature was downshifted to 34 °C at the time of the induction and for the duration of the production phase. Several studies have reported the beneficial effect of mild hypothermia on cell productivity in CHO cells (Kou, Fan, Zhou, Ye, Zhao, et al., 2011; Yoon, Kim, et al., 2003) and other cell lines (Bollati-Fogolin et al., 2005; Kumar et al., 2007).

In addition to the impacts on cell growth and productivity, we have also assessed the effects of the feeding regimes on the antibody glycan distribution. The glycosylation state of an antibody can dramatically impact its therapeutic efficacy and *in vivo* half-life (Hossler et al., 2009). There have been numerous factors shown to directly or indirectly impact product glycosylation, including the cell line (Karengera et al., 2017), the culture medium (Chee Fung Wong et al., 2005) and process operating conditions (M Butler, 2006; Yoon, Kim, et al., 2003). Accumulation of by-products (Peifeng Chen & Sarah W Harcum, 2006; Ha & Lee, 2014), as well as proteases and glycosidase release (Ana Rita Costa et al., 2014) upon cell lysis may also contribute to alter the glycosylation profile. The cell culture mode can also have a pronounced effect on the resulting glycoform profile. For instance, Lipscomb *et al.* have reported that SEAP sialylation was increased in perfusion mode compared to fed-batch, presumably because slow growing cells in perfusion produce more completely glycosylated proteins (Lipscomb et al., 2004). We could not observe such effect since the level of sialylation was consistently low in all our cultures. CHO cells typically produce highly fucosylated antibodies. The percentage of fucosylation was always greater than 90 % in our study and did not vary significantly across culture modes, process scale or culture duration. In contrast with sialylation and fucosylation, we observed changes in product galactosylation. It has been reported that terminal galactosylation positively impacts the ability of rituximab to lyse CD20 expressing cells (Jefferis, 2005). In fact, CDC function of rituximab is increased when the galactosylation index is higher, without affecting the ADCC response (Raju, 2008). It is therefore desired to maintain a high level of product galactosylation during cell culture. In shake flask cultures, decreased galactosylation of glycan chains may be related to decreasing DO levels as the

cell density increases (Kunkel, Jan, Jamieson, & Butler, 1998). In bioreactor, the fed-perfusion mode exhibited the highest percentage of galactosylation, but this percentage was found to decrease with culture duration reaching a comparable value to that of the fed-batch mode at harvest. Higher-order glycosylation (G1F, G2F) were also observed by others at early stage of perfusion (Walther et al., 2018) or fed-batch cultures (M. J. Gramer et al., 2011; Park et al., 2017), possibly related to greater nutrient or precursor availability. Our results indicate that an early culture harvest performed when cell viability is still high (around day 11) in a fed-perfusion bioreactor would thus yield a better galactosylation profile than the fed-batch or perfusion modes, along with a higher product titer that is close to the maximum achievable.

6.7 Conclusion

Our study emphasizes the need to balance between maximizing product titer and maintaining a high product quality when selecting an operating mode and identifying a suitable harvest time (Y. Fan et al., 2015). Daily bolus additions of a concentrated feed solution during the pre-induction phase was shown to greatly enhance the productivity compared to a simple batch mode for high cell density induction. We then demonstrated that a fed-perfusion strategy would enable an early culture harvest that can provide a better trade-off between product yield and quality, with little additional operational complexity. Further process improvement could potentially be achieved by optimizing the feed rate, for instance with the use of a cell specific perfusion rate during the growth phase. The application of a perfusion mode during the production phase could also be beneficial for maintaining a high product quality and achieving a higher cell specific productivity, but this would have to be balanced with the undesired increase in product dilution.

6.8 Acknowledgments

We would like to thank Mr. Denis Brochu and Mr. Michel Gilbert from the Human Health Therapeutics Research Center at National Research Council Canada (Ottawa) for performing HILIC analysis. We are thankful to Mr. Louis Bisson the Human Health Therapeutics Research Center at National Research Council Canada (Montreal) for HPLC analysis. This work was

supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). This is NRC publication #NRC_HHTXXX.

6.9 References

- Aehle, M., Schaepe, S., Kuprijanov, A., Simutis, R., & Lübbert, A. (2011). Simple and efficient control of CHO cell cultures. *Journal of biotechnology*, 153(1), 56-61.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Banik, G. G., & Heath, C. A. (1997). High-density hybridoma perfusion culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 61(3), 211-229.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: Effect on productivity and product quality. *Biotechnology progress*, 21(1), 17-21.
- Bonham-Carter, J., Weegar, J., Nieminen, A., Shevitz, J., & Eliezer, E. (2011). The Use of the ATF System to Culture Chinese Hamster Ovary Cells in a Concentrated Fed-Batch System. *Biopharm International*, 24(6), 42-+.
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1-3), 57.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic engineering*, 8(2), 123-132.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical reviews in biotechnology*, 34(4), 281-299.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Lund, A. M., Sen, J. W., Rasmussen, S. K., . . . Andersen, M. R. (2015). A multi-pronged investigation into the effect of glucose starvation and culture duration on fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 112(10), 2172-2184. doi:10.1002/bit.25620
- Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., Xie, L., Tang, H., & Chen, Z. (2006). Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. *Journal of Biotechnology*, 122(4), 422-430. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.09.017
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 108(6), 1328-1337.
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., . . . Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and bioengineering*, 106(2), 203-215.

- Gramer, M. J., Eckblad, J. J., Donahue, R., Brown, J., Shultz, C., Vickerman, K., . . . van Berkel, P. H. C. (2011). Modulation of Antibody Galactosylation Through Feeding of Uridine, Manganese Chloride, and Galactose. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(7), 1591-1602. doi:10.1002/bit.23075
- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of biotechnology*, 180, 23-29.
- Henry, O., & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic engineering*, 13(5), 499-507.
- Henry, O., Kwok, E., & Piret, J. M. (2008). Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnol Prog*, 24(4), 921-931. doi:10.1002/btpr.17
- Hiller, G. W., Ovalle, A. M., Gagnon, M. P., Curran, M. L., & Wang, W. (2017). Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng*, 114(7), 1438-1447. doi:10.1002/bit.26259
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949.
- Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology progress*, 26(5), 1400-1410.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology progress*, 21(1), 11-16.
- Karengera, E., Robotham, A., Kelly, J., Durocher, Y., De Crescenzo, G., & Henry, O. (2017). Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: impact on recombinant glycoprotein quality. *Journal of biotechnology*, 242, 73-82.
- Kou, T.-C., Fan, L., Zhou, Y., Ye, Z.-Y., Zhao, L., & Tan, W.-S. (2011). Increasing the productivity of TNFR-Fc in GS-CHO cells at reduced culture temperatures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 136-143.
- Kumar, N., Gammell, P., & Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53(1-3), 33-46.
- Kunkel, J. P., Jan, D. C., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 62(1), 55-71.
- Kuwaie, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., & Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(5), 502-510.
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of biotechnology*, 251, 128-140.
- Lao, M. S., & Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology progress*, 13(5), 688-691.
- Lee, S.-Y., Kwon, Y.-B., Cho, J.-M., Park, K.-H., Chang, S.-J., & Kim, D.-I. (2012). Effect of process change from perfusion to fed-batch on product comparability for biosimilar monoclonal antibody. *Process Biochemistry*, 47(9), 1411-1418.

- Lipscomb, M. L., Mowry, M. C., & Kompala, D. S. (2004). Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor. *Biotechnology progress*, 20(5), 1402-1407.
- Lu, F., Toh, P. C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, J. (2013). Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1), 191-205.
- Matthews, T. E., Berry, B. N., Smelko, J., Moretto, J., Moore, B., & Wiltberger, K. (2016). Closed loop control of lactate concentration in mammalian cell culture by Raman spectroscopy leads to improved cell density, viability, and biopharmaceutical protein production. *Biotechnology and bioengineering*, 113(11), 2416-2424.
- Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., . . . Kadouri, A. (2006). Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality. *Journal of biotechnology*, 123(1), 106-116.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., . . . Lo, R. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC biotechnology*, 6(1), 43.
- Noh, S. M., Shin, S., & Lee, G. M. (2018). Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. *Sci Rep*, 8(1), 5361. doi:10.1038/s41598-018-23720-9
- Ozturk, S. S. (1996). Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*, 22(1-3), 3-16.
- Park, J. H., Jin, J. H., Lim, M. S., An, H. J., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2017). Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells. *Scientific Reports*, 7. doi:ARTN 44246
10.1038/srep44246
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3).
- Poulain, A., Sylvie, P., Malenfant, F., Allaka, M., Bernard, M., & Yves, D. (2017). Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *Journal of Biotechnology*(255), 16-27.
- Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current opinion in immunology*, 20(4), 471-478.
- Robinson, D., DiStefano, D., Gould, S., Cuca, G., Seamans, T., Benincasa, D., . . . Hollis, G. (1995). Production of engineered antibodies in myeloma and hybridoma cells: enhancements in gene expression and process design: ACS Publications.
- Sauer, P. W., Burky, J. E., Wesson, M. C., Sternard, H. D., & Qu, L. (2000). A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and bioengineering*, 67(5), 585-597.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013a). The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 162-171.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013b). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. *Journal of biotechnology*, 164(4), 469-478.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2014). Elucidating the effects of postinduction glutamine feeding on the growth and productivity of CHO cells. *Biotechnology progress*, 30(3), 535-546.

- Sunley, K., & Butler, M. (2010). Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology Advances*, 28(3), 385-394. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.003
- Teng, X., Yi, X., Sun, X., & Zhang, Y. (2011). Modeling and Application of Controlled-fed Perfusion Culture of CHO Cells in a Bioreactor. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 25(3), 385-394.
- Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 217, 122-131.
- Vallée, C., Durocher, Y., & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 169, 63-70.
- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P. A., Baer, G., & Kadouri, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(7), 751-765.
- Walther, J., Lu, J., Hollenbach, M., Yu, M., Hwang, C., McLarty, J., & Brower, K. (2018). Perfusion Cell Culture Decreases Process and Product Heterogeneity in a Head-to-Head Comparison With Fed-Batch. *Biotechnology Journal*, e1700733. doi:10.1002/biot.201700733
- Wlaschin, K. F., & Hu, W.-S. (2006). Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding *Cell Culture Engineering* (pp. 43-74): Springer.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
- Yang, J. D., Angelillo, Y., Chaudhry, M., Goldenberg, C., & Goldenberg, D. M. (2000). Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. *Biotechnol Bioeng*, 69(1), 74-82.
- Yang, J. D., Angelillo, Y., Chaudhry, M., Goldenberg, C., & Goldenberg, D. M. (2000). Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. *Biotechnology and bioengineering*, 69(1), 74-82.
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 68(4), 370-380.
- Yang, W. C., Minkler, D. F., Kshirsagar, R., Ryll, T., & Huang, Y. M. (2016). Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity. *Journal of Biotechnology*, 217, 1-11. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.10.009
- Yoon, S. K., Kim, S. H., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on foreign protein production in recombinant CHO cells *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 163-167): Springer.
- Yusufi, F. N. K., Lakshmanan, M., Ho, Y. S., Loo, B. L. W., Ariyaratne, P., Yang, Y., . . . Lim, H. L. (2017). Mammalian systems biotechnology reveals global cellular adaptations in a recombinant CHO cell line. *Cell systems*, 4(5), 530-542. e536.
- Zhang, L., Shen, H., & Zhang, Y. (2004). Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(2), 171-181.
- Zhou, W., Rehm, J., & Hu, W. S. (1995). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and bioengineering*, 46(6), 579-587.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le présent travail a porté sur le développement de stratégies de culture visant à améliorer les performances d'un système CHO inductible en termes de rendement de production et de qualité de l'anticorps. Lors de toute culture cellulaire, les paramètres déterminants pour le rendement final sont la concentration cellulaire, la durée de la culture et la productivité spécifique des cellules. On cherche généralement à les maximiser simultanément ou à trouver le meilleur compromis. Le choix d'un mode de culture et la définition de conditions opératoires optimales sont des éléments essentiels. Les modes cuvée-alimentée et perfusion ont été jusqu'à aujourd'hui les procédés les plus employés pour la production de protéines thérapeutiques (Vallée et al., 2014). Si la littérature abonde d'études relatives au développement de tels procédés dans le cas de clones avec expression constitutive d'un produit d'intérêt, il en est tout autrement en ce qui a trait aux systèmes d'expression mammifères inductibles.

Pour la production de protéines recombinantes, l'utilisation de systèmes d'expression constitutifs demeure largement prépondérante. L'utilisation de systèmes inductibles est généralement envisagée seulement dans les cas où le produit à synthétiser est cytotoxique, ce qui limite l'atteinte de concentrations élevées en biomasse et donc les rendements de production. Dans des systèmes constitutifs, la protéine d'intérêt est exprimée de manière stable dès que les cellules sont mises en culture. Les processus intracellulaires liés d'une part à la croissance et d'autre part à la synthèse du produit d'intérêt se déroulent simultanément. Il en résulte donc une charge métabolique additionnelle pour la cellule qui doit consacrer une part significative de ses ressources (e.g. énergie, précurseurs) pour supporter la production et la sécrétion de la protéine d'intérêt (Glick, 1995). Dans le cas d'une lignée cellulaire présentant une productivité spécifique élevée, la protéine hétérologue peut représenter jusqu'à 20% de la masse totale des protéines intracellulaires. En raison de cette compétition interne pour les ressources cellulaires, il est fréquent d'observer une relation inverse entre productivité spécifique et croissance cellulaire. Ainsi, les clones les plus productifs présentent souvent des taux de croissance plus faibles (Yallop, Norby, Jensen, Reinbach, & Svendsen, 2003). Comme il est souhaitable de maximiser à la fois la croissance et la productivité, le recours à des systèmes d'expression inductibles peut donc être avantageux en permettant d'orienter l'énergie et autres ressources intracellulaires d'abord vers la croissance, puis, après avoir

atteint une concentration en biomasse suffisamment élevée, rediriger une partie de ces ressources cellulaires vers la production une fois le système induit.

7.1 Le moment d'induction comme paramètre critique des cultures

Le point culminant entre les deux phases de croissance et de production est le moment d'induction. D'après de précédentes observations basées sur l'analyse de flux métaboliques dans des conditions de cultures batch, induire à haute densité cellulaire ($\sim 5 \times 10^6$ cells/mL) s'avère être non bénéfique en terme de production volumétrique en raison de la limitation en nutriments et de l'accumulation de déchets (Zahra Sheikholeslami et al., 2013a). En considérant les informations tirées de cette étude métabolique, nous avons investigué l'impact du moment d'induction (Annexe B, Table B.1) dans des conditions de culture cuvée-alimentée afin de pallier la déplétion en nutriments essentiels. Ceci a été accompli en balayant une large gamme de densités cellulaires à l'induction, ce qui rendait possible l'utilisation d'un milieu plus riche que celui utilisé par Sheikholeslami et al. Notre étude a permis de mettre en évidence que le moment d'induction demeure un paramètre critique pour la performance des cultures en mode cuvée-alimentée. En effet, lorsque les cultures sont induites à faible densité cellulaire, on observe une croissance cellulaire significative durant la période post-induction (Annexe B, figure B.1) qui semble nuire à la productivité spécifique des cellules, sans doute en raison d'une compétition pour les ressources cellulaires (précurseurs, énergie). À l'inverse, une induction effectuée à trop haute densité cellulaire est caractérisée par une durée significativement réduite de la phase de production, sans doute en raison de limitations et/ou inhibitions. Compte tenu de l'effet du moment d'induction sur le rendement des cultures, le développement subséquent d'un procédé en mode cuvée-alimentée s'est effectué en considérant toujours deux concentrations cellulaires (moyenne et haute densité cellulaire) afin d'évaluer le potentiel des différentes stratégies à lever, en partie du moins, les limitations.

7.2 Impact des stratégies sur le rendement des cultures

La flexibilité qu'offre le système inductible du point de vue opérationnel nous a permis de porter un regard distinct sur les conditions de culture de chaque phase, dans le but d'amener les cellules dans un état optimal de croissance ou de production.

Dans un premier temps, nous avons montré les améliorations encourues par l'emploi d'un mode cuvée-alimentée avec ajustement dynamique du taux d'alimentation tout au long de la culture, soit dans les phases de croissance et de production. Les résultats de nos travaux ont montré que ce mode de culture conduit à une augmentation de la productivité spécifique et de la production volumétrique par rapport au mode cuvée. Bien que l'expression de l'anticorps survienne essentiellement lors de la phase post-induction, nous avons démontré l'importance de supplémenter les cultures dès le début de la phase de croissance pour réduire les risques de limitations nutritionnelles pouvant nuire au rendement final. Nous avons également mis en lumière l'importance du taux d'alimentation dans ce type de culture. Les besoins cellulaires en début de culture sont généralement faibles et la supplémentation en nutriments peut conduire à l'accumulation de métabolites non-désirables (Ma et al., 2009). Notamment, de hautes concentrations en glucose dans le milieu de culture sont généralement caractérisées par un taux de consommation élevé, suivi d'une oxydation incomplète laissant place à une production importante de lactate, même en présence de suffisamment d'oxygène (Gowtham et al., 2017). De ce fait, ajuster la quantité de nutriments à ajouter à la culture est déterminant pour éviter, d'une part, le risque de suralimentation des cellules, et d'autre part, de sur-concentrer certains nutriments secondaires qui peuvent devenir inhibiteurs à de hauts niveaux. Nous avons démontré au cours de cette étude l'effet néfaste d'un régime d'alimentation trop agressif sur la croissance et le rendement des cultures. Néanmoins, les cultures induites à haute densité cellulaire présentaient une production spécifique significativement réduite même en mode cuvée-alimentée. Du point de vue métabolique, et en dépit de la disponibilité du glucose dans le milieu extracellulaire, le taux de consommation lors des 48h précédant l'induction demeure relativement faible pour la culture induite à haute densité cellulaire par rapport aux autres conditions d'induction. Cela peut laisser suggérer un état cellulaire moins actif et une moindre production d'énergie.

Notons que la majorité des études rapportent l'effet bénéfique du changement d'état métabolique du lactate vers sa consommation sur la productivité spécifique (Le et al., 2012; Templeton et al., 2013). Dans notre cas, le changement partiel du lactate est suivi d'une accumulation jusqu'à la fin des cultures et ce pour pratiquement toutes les conditions testées. Par ailleurs, cette corrélation peut être dépendante de la lignée cellulaire utilisée (Honda, Lenas, Watanabe, Kitade, & Kobayashi, 1998; Kurokawa et al., 1994).

D'autres stratégies de culture ont alors été envisagées afin de promouvoir l'induction à haute densité cellulaire et d'améliorer les rendements. En effet, des cultures réalisées avec un changement

(partiel ou total) du milieu de culture au moment de l'induction ont montré une augmentation de la concentration cellulaire et de la productivité, tant en modes cuvée que cuvée-alimentée. Outre un apport en nutriments, ce changement de milieu a pour effet de diluer la concentration en métabolites susceptibles d'inhiber les cultures. Ceci nous a amenés à considérer le recours à un mode perfusion, mais uniquement pendant la phase de croissance afin d'éviter de diluer le produit d'intérêt. Un mode cuvée-alimentée était cependant utilisé lors de la phase de production. Enfin, plutôt que de choisir entre cultiver les cellules en mode cuvée-alimentée ou perfusion, nous avons également tenté d'exploiter les avantages que peuvent offrir ces deux procédés combinés (Jeng-Dar Yang et al., 2000). La stratégie de culture perfusion-alimentée a montré une augmentation considérable de l'intégrale de cellules viables comparée aux cultures cuvée-alimentée et perfusion. Les rendements ont augmenté de façon appréciable dans les cultures en flacons, mais sont restées relativement similaires en bioréacteur pour les différents modes. Néanmoins, le mode perfusion-alimentée permet d'atteindre des concentrations proches du maximum en un temps plus court, ce qui peut conférer un avantage en termes de productivité pour un temps de récolte plus court.

Maintenir une bonne viabilité cellulaire sur de longues périodes est souvent souhaitable pour assurer des rendements de production élevés (S Oguchi et al., 2003). L'une des approches les plus employées est la réduction de la température visant à ralentir ou à arrêter la croissance et prolonger ainsi la phase de production. Les effets de la température sur la croissance et sur le cycle cellulaire ont été largement documentés dans le cas des lignées CHO stables (Kumar et al., 2007). Notre étude comparative des cinétiques de croissance et de production a démontré que des conditions légèrement hypothermiques pendant la phase de production permettent d'améliorer significativement les rendements en produit, tant à basse qu'à haute densité cellulaire à l'induction. Cependant, faire croître les cellules à 34 °C dans la phase pré-induction pour minimiser la variation de température au moment de l'induction n'a pas donné lieu à de bonnes performances, en flacons comme en bioréacteur.

En examinant les rendements obtenus dans toutes les cultures effectuées dans le cadre de cette thèse, on constate que la meilleure production (1.8 g/L) correspond à un bioréacteur opéré en mode cuvée-alimentée à des températures de 37-30 °C. La culture en mode perfusion-alimentée, opérée pour sa part à 37-34 °C, a conduit à des titres maximums plus faibles (1.5 g/L en flacons, 1.2 g/L en bioréacteur), mais présente la productivité volumétrique la plus intéressante si on considère une récolte effectuée plus tôt (dont l'avantage est discuté dans la section suivante). Une perfusion-alimentée opérée à 37-30 °C n'a toutefois pas été effectuée.

7.3 Impact des stratégies sur le profil de glycosylation du produit

En plus de maintenir des niveaux de production élevés, assurer la qualité du produit final est un défi majeur dans l'industrie biopharmaceutique. Notre première étude a montré qu'en dépit des différences observées au niveau des rendements lorsque la densité cellulaire à l'induction varie en mode cuvée-alimentée, il n'y a pas eu d'impact notable sur la qualité de l'anticorps au moment de la récolte, que ce soit en flacons ou en bioréacteur. Cependant, l'analyse des échantillons prélevés à différents moments a révélé une décroissance graduelle au cours du temps des fractions mono- et di-galactosylées, en faveur de la fraction non-galactosylée. Cette réduction peut être liée au déclin de la viabilité et donc à la dégradation des conditions environnementales. En effet, l'accumulation de déchets métaboliques toxiques (Claudia Altamirano et al., 2004; Genzel et al., 2005) et une augmentation des protéases et glycosidases dans le milieu de culture (M Butler, 2006; Ana Rita Costa et al., 2014; Tan et al., 2015) peuvent être à l'origine de l'altération de la glycosylation du produit.

D'autre part, plusieurs paramètres de culture sont susceptibles d'avoir un impact sur la qualité du produit, notamment le pH, la température, l'osmolarité et les concentrations en gaz dissous (pCO_2 et DO) (Hossler et al., 2009). Nos résultats ont montré qu'en plus de l'amélioration des productions spécifique et volumétrique, le pourcentage de galactosylation s'avère être plus élevé dans le cas d'une réduction de la température de 37 °C en phase de croissance vers 30 °C lors de la phase de production. Par contre, un état légèrement hypothermique (34 °C) lors de la période de croissance ne favorisait pas une meilleure galactosylation du produit. Ceci contraste quelque peu avec la littérature, puisque certaines études ont rapporté que, dans la majorité des cas, les patrons de glycosylation ainsi que l'activité *in vitro* de la protéine d'intérêt produite à une température de 37 °C ou bien dans un état hypothermique ne montraient pas de différences significatives (Becerra, Berrios, Osses, & Altamirano, 2012; Bollati-Fogolín et al., 2005). Des conditions d'osmolalité élevée ou d'oxygène dissous très faible ont également été associées avec une baisse de la galactosylation (Kunkel et al., 1998; Schmelzer & Miller, 2002). De ces deux facteurs, seul le premier entre peut être en jeu dans nos cultures puisque le second paramètre était maintenu constant lors des cultures en bioréacteurs. Enfin, certaines recherches ont rapporté l'influence du mode de culture sur la qualité du produit d'intérêt (Hossler et al., 2009). Dans nos travaux, en considérant uniquement les cultures effectuées avec les mêmes conditions de température (37-34 °C), le mode

hybride (perfusion-alimentée) a montré un meilleur pourcentage de galactosylation comparé au mode cuvée-alimentée, mais les différences notées s'estompent avec la durée des cultures. De manière générale, les pourcentages de galactosylation obtenus pour les différentes stratégies de culture testées dans le cadre de ces travaux varient entre 63 et 81%. Comme mentionné précédemment, les anticorps retrouvés chez l'humain possèdent une fraction galactosylée d'au moins 60% (Anumula, 2012). Les industries biopharmaceutiques visent ainsi à avoir des anticorps très galactosylés afin d'avoir une meilleure réponse immunitaire, en particulier lorsque le mécanisme de fonction principal de l'anticorps passe par la CDC. A titre indicatif, le pourcentage de galactosylation dans les lots commerciaux de Rituximab se situe entre 45 % et 55 % (K. H. Lee et al., 2018; Miranda-Hernandez et al., 2015). La galactosylation de l'anticorps influence la conformation du domaine CH2 en maintenant les deux chaînes polypeptidiques dans un état ouvert, ce qui facilite la liaison de l'anticorps aux récepteurs Fcγ, au composant C1q, et aux récepteurs FcRn. Par le fait même, les résidus galactose terminaux influencent les fonctions effectrices de l'anticorps, en particulier en améliorant la CDC et en atténuant l'inflammation. Du point de vue fonctionnel, la galactosylation étend également la demi-vie des anticorps en circulation en empêchant les interactions entre les résidus GlcNAc et le récepteur mannose.

En considérant toutes les expériences effectuées dans leur ensemble, on constate que les plus hauts pourcentages de galactosylation ont été obtenus sous des conditions de bonne viabilité cellulaire pour les cultures fed-batch en bioréacteurs (37-30 °C et 34-30 °C) et pour le bioréacteur opéré en mode perfusion-alimentée (37-34 °C). De façon générale, on peut donc penser que pour maintenir la qualité du produit, il est souhaitable d'effectuer la production à basse température (30 °C) et il faut chercher à minimiser le temps de récolte, c'est-à-dire maximiser la productivité pour atteindre rapidement une concentration satisfaisante en anticorps. Comme évoqué précédemment, une culture en mode perfusion-alimentée avec une température de 30 °C pendant la phase de production n'a cependant pas été réalisée dans le cadre de cette thèse.

Les travaux menés dans ce projet ont permis de démontrer qu'en plus du moment d'induction dans le cas d'un système inductible, définir une stratégie de culture est tout aussi crucial. En effet, un procédé de culture bien établi contribue à amener les cellules dans un état physiologique plus efficace contribuant ainsi à l'amélioration des concentrations cellulaires et des rendements de production tout en garantissant un profil de glycosylation efficace. Enfin, en dépit du fait qu'augmenter la longévité des cultures soit souvent un objectif poursuivi pour maximiser le rendement en produit, ceci peut avoir des conséquences indésirables sur la qualité du produit et il

faut donc plutôt chercher un compromis acceptable. Il est donc primordial de toujours considérer ces deux facteurs simultanément (rendement et qualité) dans le choix d'un mode de culture et d'un temps de récolte appropriés.

Avec la demande croissante en protéines recombinantes, une capacité de production accrue est nécessaire. En 2001, la société Immunex par exemple, a rencontré un problème majeur lorsque la demande en Enbrel (protéine de fusion utilisée pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde) a dépassé les attentes donnant lieu à une capacité de production insuffisante pour répondre à cette demande. Cet épisode a mis en évidence que le portefeuille de produits biothérapeutiques s'étend plus rapidement que la capacité de production mondiale (Michael Butler, 2005). Durant la dernière décennie, des progrès importants ont été réalisés grâce à l'optimisation des procédés de production (USP : *upstream processing*). Aujourd'hui, des concentrations en anticorps de 3 à 5 g/L sont presque systématiquement atteintes et certaines productions rapportent jusqu'à 13 g/L en mode cuvée-alimentée et jusqu'à 25 g/L en mode perfusion (Michael Butler & Meneses-Acosta, 2012; Kelley, 2007). Ces procédés de production qui génèrent des titres élevés ont encore lieu dans les mêmes configurations de réacteur que les procédés antérieurs avec titres plus faibles. Par conséquent, les volumes traités sont les mêmes mais la quantité d'anticorps est augmentée. Il en résulte des volumes contenant de 15 à 100 kg d'anticorps par lot à raison de 5 g/L dans des bioréacteurs de 20 à 25 kL au lieu de 5 à 10 kg d'anticorps par lot (Gronemeyer, Ditz, & Strube, 2014). Le traitement en aval (DSP : *downstream processing*) de ces quantités de produits entraîne une augmentation du temps de purification et des coûts. Par conséquent, les capacités de production en amont peuvent être augmentées sans accroître les coûts, alors que les procédés de purification s'adaptent en raison des principes physiques de séparation sur lesquels ils sont basés. Ainsi, de hauts rendements déplacent les principaux coûts de production vers la DSP. D'ailleurs, on rapporte que les budgets alloués aux nouvelles technologies utilisées en DSP ont augmenté de 2.5% à 6.4% entre 2009 et 2011 (Langer, 2011). La production d'anticorps à l'échelle industrielle implique typiquement une série de clarification par centrifugation et/ou filtration. S'en suit des étapes de chromatographies qui débutent par une chromatographie de capture (généralement une chromatographie par affinité - Protéine A) pour réduire les volumes de récolte et éliminer la majorité des impuretés. Le second type de chromatographie, appelé également polissage, consiste en une inactivation virale à pH faible, une étape de filtration virale et échange de tampon/concentration. Cette seconde étape conduit à l'élimination de diverses impuretés comme l'ADN, les protéines lixiviées, les endotoxines, les virus, les agrégats, etc. Une purification efficace

doit conduire à une pureté $> 95\%$ ce qui inclut des quantités résiduelles de protéines de la cellule hôte < 100 ppm, des débris d'ADN < 10 ng/dose et une quantité d'agrégats hautement immunogènes $< 5\%$ (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011). Comme résultante à l'augmentation des productivités cellulaires, les industries ont orienté leurs efforts vers l'augmentation des capacités des résines et l'élaboration de nouvelles membranes plus robustes (J. A. C. Lim, Sinclair, Kim, & Gottschalk, 2007). Vogel et al. (Vogel et al., 2012) ont développé une plateforme de séparation pour leurs productions en mettant en place des membranes d'absorption spécifiques. Les approches d'optimisation actuelles visent ainsi l'ensemble des opérations USP et DSP qui se concentrent sur les rendements en produit, les agrégats, la teneur en ADN et la présence d'isoformes. De plus, la demande en produits biologiques continuera à augmenter au cours des prochaines années. L'arrivée à échéance de brevets ainsi que les pressions réglementaires constituera un défi majeur, celui d'une intégration très minutieuse du développement des procédés USP et DSP et des coûts associés.

Dans ce contexte, un facteur important à considérer concerne l'applicabilité (incluant la mise à l'échelle) des stratégies développées dans le cadre de cette thèse. Le recours au mode cuvée-alimenté est déjà largement utilisé dans l'industrie biopharmaceutique. Cependant, l'utilisation d'une alimentation dynamique telle que décrite dans nos travaux, bien que relativement simple à mettre en œuvre, pourrait néanmoins rencontrer des difficultés d'acceptation par une industrie relativement rigide aux changements parce que soumise à un cadre réglementaire strict. Dans le cas de bioprocédés de fabrication déjà en place, l'application d'une nouvelle stratégie exigerait une démonstration de la comparabilité afin d'assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité du produit après les changements apportés au procédé. Bien que les solutions techniques existent déjà pour permettre l'implantation de stratégies dynamiques robustes (e.g. auto-échantillonneurs couplés à des analyseurs biochimiques pour une évaluation en-ligne des nutriments/catabolites), les pratiques continuent reposer surtout sur des protocoles d'alimentation préétablis afin de minimiser la variabilité entre lots et maintenir une conformité aux spécifications du produit.

Néanmoins, à partir d'un certain nombre de productions réalisées à petite échelle avec un régime dynamique, il serait aisé d'en inférer un protocole pré-défini applicable à grande échelle pour une culture dont le déroulement s'avère reproductible d'un cycle de production à l'autre (Aehle et al., 2011). Par ailleurs, les agences réglementaires, la FDA en tête, incitent de plus en plus l'industrie à adopter les concepts de PAT (Process Analytical Technologies) et de Qualité par Design, qui impliquent l'utilisation de nouvelles approches habilitantes permettant d'améliorer l'efficacité de production et la qualité des produits. On peut donc penser que l'implantation de

stratégies dynamiques est appelée à connaître une plus grande acceptation dans l'industrie biopharmaceutique en général.

L'approche de culture reposant sur des changements de milieu qui a été effectuée en flacons serait bien sûr difficilement transposable à grande échelle et avait surtout pour but d'évaluer le potentiel d'un mode perfusion pour améliorer les rendements de production. Toujours dans une perspective de transposition à l'échelle industrielle, le recours à un mode de production en perfusion (ou le mode hybride fed-perfusion) qui opère à des densités cellulaires élevées a des conséquences au niveau des étapes de séparation et de purification en aval, en raison des volumes plus importants à traiter et de la présence accrue de débris/résidus cellulaires découlant des hautes densités atteintes. Néanmoins, il faut souligner que le mode perfusion décrit dans le cadre de cette thèse n'est appliqué que durant la phase de croissance (i.e. seulement durant quelques jours) et le taux de perfusion employé (20 % de volume par jour) était relativement faible en comparaison avec les procédés en perfusion classiques qui perfusent parfois de 1 à 2 volumes par jour pendant plusieurs semaines et parfois plusieurs mois. D'autre part, le développement continuuel de modules de rétention efficaces comme l'ATF pouvant supporter de hautes concentrations cellulaires a permis de faciliter les procédés de perfusion à grande échelle (John Bonham-Carter & Shevitz, 2011). Enfin, le traitement DSP de ces cultures à haute densité cellulaire issues de procédés perfusion a fait l'objet de plusieurs études qui ont proposé des techniques de purification comme la filtration en utilisant des membranes de plus en plus performantes (Fahrner et al., 2001; P. Gagnon, 2010).

Pour conclure, les travaux de cette thèse ont été réalisés en utilisant un système modèle spécifique, soit une lignée cellulaire CHO inductible au cumate produisant du rituximab. Ceci soulève la question du caractère générique ou non des approches et des résultats présentés dans cette thèse. Nos travaux ont notamment mis en lumière l'importance de l'état physiologique des cellules au moment d'initier la production. Des observations similaires ont été faites auparavant dans le cas d'une autre lignée CHO inductible (non-GS) produisant un anticorps anti-CD20, ce qui suggère que le moment d'induction est un paramètre critique qui devrait toujours faire l'objet d'une attention particulière lors des efforts d'optimisation, quel que soit le clone/produit. C'est d'ailleurs également le cas pour les fermentations microbiennes. Plusieurs conditions ou stratégies opératoires utilisées dans le cadre de cette thèse seraient directement transposables à tout autre système (e.g. réduction de la température post-induction, alimentation dynamique basée sur la

consommation de glucose, etc.). Il est attendu que les rendements en produit sont susceptibles de varier d'un clone à un autre. Typiquement, pour maximiser un rendement, le protocole d'alimentation et la nature de la solution concentrée de nutriments doivent faire l'objet d'une optimisation spécifique à la lignée employée. Cependant, les entreprises se tournent de plus en plus vers le développement d'une « plateforme de production » qui ne procure pas nécessairement les productivités volumétriques les plus élevées pour des lignées cellulaires/produits donnés, mais qui s'applique à un large éventail de systèmes (lignée/produit) et peut s'implémenter avec un minimum de modifications au niveau du procédé et des stratégies d'opération. De la même façon, pour une lignée CHO exprimant un autre anticorps, les résultats de cette thèse pourraient servir de bon point de départ pour une optimisation plus fine des conditions.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans le but de répondre aux besoins croissant du marché et de générer efficacement des protéines recombinantes de qualité à faible coût, l'amélioration des rendements des procédés de culture cellulaire demeure un élément crucial.

Ce projet visait à développer des stratégies de culture pour maximiser la croissance et la productivité d'un système inductible au cumate. Il se doit d'être souligné que ce travail s'inscrit parmi les premiers à se pencher sur le développement et l'optimisation d'un système d'expression mammifère inductible. Nous avons montré qu'un mode cuvée-alimentée employant une stratégie d'alimentation dynamique permettait d'améliorer significativement la performance des cultures, mais que les rendements en produit pouvaient varier selon la densité cellulaire à l'induction. En effet, l'induction à très faible ou très haute densité cellulaire peut nuire au titre final en produit. En comparant différents régimes d'alimentation, nous avons également établi que pallier les limitations en nutriments dès le début des cultures et maintenir un taux d'alimentation modéré permettait l'obtention d'une meilleure croissance cellulaire et d'un plus haut rendement en produit. L'emploi d'un procédé bi-phasique a aussi démontré son efficacité en permettant de déterminer les conditions de température favorables à l'atteinte de hauts rendements en produits. Nous avons également montré qu'il était possible d'induire les cultures à haute densité cellulaire en utilisant des modes de culture hybrides comme la perfusion-alimentée qui permet d'accroître la productivité volumétrique des cultures.

En parallèle à l'amélioration des rendements de production, l'aspect qualité de l'anticorps produit a aussi été suivi de près afin d'évaluer l'impact des stratégies d'alimentation et des paramètres opératoires sur le patron de glycosylation. Ceci nous a permis d'établir que le pourcentage de galactosylation du produit a tendance à diminuer avec la durée des cultures, quel que soit le mode de production. D'autre part, l'emploi d'un procédé bi-phasique a démontré qu'un meilleur profil de galactosylation est obtenu lorsque les cultures sont conduites à température physiologique pendant la phase de croissance avant de réduire la température vers un état hypothermique pendant la phase de production. Nous avons également montré que les anticorps produits en mode perfusion-alimentée présentent un meilleur profil de glycosylation à un temps de récolte plus court, ce qui confère à ce mode hybride un certain avantage par rapport au mode cuvée-alimentée.

Ce travail a donc permis de mettre en lumière l'impact de différentes stratégies de culture sur la croissance et le rendement en produit du système inductible au cumate. Nous avons exploité avec

succès les avantages que peut conférer un tel système en matière de flexibilité du point de vue opérationnel.

Les recommandations ci-dessous pourraient contribuer à de futurs travaux :

Étudier l'impact d'induire à plus haute densité cellulaire ($> 10 \times 10^6$ cells/mL)

Des études préliminaires effectuées en flacons en mode perfusion-alimentée nous ont permis de constater le potentiel des cellules à croître à de très hautes densités cellulaires (entre 30 et 40 $\times 10^6$ cells/mL) en effectuant des changements de milieu fréquents et importants (remplacement de 20% à 100% du volume de culture sur une base quotidienne) (voir figure annexe A). Tenant compte de ces observations, il serait intéressant de retarder le moment d'induction et d'en déterminer l'impact sur la productivité des cultures et la qualité de produit, notamment en bioréacteur. Considérant l'impact du temps de résidence sur la qualité du produit, une courte durée de production qui serait compensée par une biomasse élevée pourrait s'avérer avantageuse. Le taux de perfusion pourrait également être optimisé pour de meilleures performances, par exemple en utilisant un taux d'alimentation ajusté dynamiquement en fonction de la densité cellulaire.

On pourrait par exemple faire croître les cellules en mode perfusion-alimentée avec des changements de milieu importants (50-100% du volume de culture) pour atteindre de hautes concentrations cellulaires. Par la suite, induire la production et appliquer une stratégie d'alimentation dynamique tout en supprimant la perfusion afin d'éliminer l'effet indésirable de la dilution du titre en produit final.

Étudier l'impact d'une réduction de la température à 30 °C ou moins en mode perfusion-alimentée

L'effet de la réduction de la température sur la productivité des cellules de mammifères a depuis longtemps fait ses preuves dans le cas des systèmes avec expression constitutive. Au cours de ce travail, nous avons ainsi montré l'impact positif de ce paramètre en particulier dans le cas d'induction à haute densité cellulaire pour des états hypothermiques en mode cuvée-alimentée. Compte tenu du fait que nous avons observé de la croissance cellulaire même aux températures les plus basses utilisées, il serait ainsi intéressant d'évaluer l'impact combiné de la réduction de la température à différents niveaux (≤ 30 °C) lors des cultures perfusées-alimentées avec des inductions à très hautes densités cellulaires (stratégies présentées précédemment).

Étudier l'impact de l'ajout des précurseurs de glycosylation

De nos jours, les compagnies biopharmaceutiques mettent beaucoup d'emphasis sur la qualité des protéines recombinantes. De ce fait, plusieurs études se sont penchées sur des approches au niveau cellulaire ou au niveau du procédé pour améliorer ou maintenir une meilleure qualité du produit sans affecter les productivités. Plusieurs études ont démontré que l'enrichissement des milieux de culture avec des précurseurs de biosynthèse des glycanes avait un impact bénéfique sur la glycosylation du produit. C'est le cas par exemple, lorsque des ajouts de galactose et de manganèse sont effectués en cours de culture. Bien que ces composés soient peut-être déjà présents dans le milieu de base ou dans la solution concentrée de nutriments, il pourrait être intéressant d'évaluer si des ajouts complémentaires pourraient par exemple contrer la réduction observée au niveau du pourcentage de galactosylation au cours du temps.

Étudier l'impact de la réorientation du métabolisme du glucose (PYC)

L'accumulation de déchets métaboliques a longtemps été un frein à la croissance et à la productivité des cultures de cellules de mammifères. Plusieurs approches de génie métabolique ont été mises en place afin d'y remédier. La lignée cellulaire employée dans le cadre de ce projet est dotée du gène glutamine synthétase permettant aux cellules de croître dans un milieu sans glutamine et de réduire ainsi la production d'ammoniaque. Utiliser une stratégie afin de réduire l'accumulation de lactate pourrait également être bénéfique. Il serait possible de modifier le métabolisme central des CHO grâce à l'expression du gène PYC2, qui a précédemment montré son efficacité en améliorant la croissance et la production d'anticorps dans le cas d'un clone avec une expression stable (Toussaint et al., 2016). Ceci permettrait de réduire simultanément l'accumulation de lactate et d'ammoniaque.

Enfin, afin d'évaluer le caractère générique de nos résultats, il serait judicieux d'étudier l'impact de telles stratégies de culture pour d'autres produits et sur d'autres lignées cellulaires (les HEK293 par exemple). En effet, avant d'adapter le système inductible au cumate sur les cellules CHO, il a d'abord été développé sur les cellules HEK293 (Mullick et al., 2006). Par ailleurs, aucun développement de procédés d'opération n'a été entamé dans le but d'augmenter les rendements de production en utilisant les cellules HEK293. Il serait donc intéressant de vérifier l'application des stratégies de culture développées dans ce travail sur cette lignée et pour la production de glycoprotéines ou autres produits issus de cellules HEK293, comme les vecteurs viraux utilisés pour la livraison ciblée de médicament. D'autre part, l'utilisation de ce système inductible pour la

production d'autres produits biologiques comme certaines molécules cytotoxiques ou cytostatiques pourrait être d'un grand intérêt vu l'impact de la présence de ces molécules dans l'environnement cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Abès, R., & Teillaud, J.-L. (2010). Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals*, 3(1), 146-157.
- Aehle, M., Schaepe, S., Kuprijanov, A., Simutis, R., & Lübbert, A. (2011). Simple and efficient control of CHO cell cultures. *Journal of biotechnology*, 153(1), 56-61.
- Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic engineering*, 13(5), 598-609.
- Ahn, W. S., Jeon, J. J., Jeong, Y. R., Lee, S. J., & Yoon, S. K. (2008). Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(6), 1234-1244.
- Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., & Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 10-10.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J., & Godia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547-556.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69-75.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J., & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Andersen, D. C., & Goochee, C. F. (1995). The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 47(1), 96-105.
- Andersen, M. R., Hyun Nam, J., & Sharfstein, S. T. (2011). Protein glycosylation: analysis, characterization, and engineering. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*.
- Anumula, K. R. (2012). Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *Journal of immunological methods*, 382(1-2), 167-176.
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S., & Mayr, L. M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current opinion in structural biology*, 23(3), 393-402.
- Avello, V., Tapia, B., Vergara, M., Acevedo, C., Berrios, J., Reyes, J. G., & Altamirano, C. (2017). Impact of sodium butyrate and mild hypothermia on metabolic and physiological behaviour of CHO TF 70R cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 55-62.
- Baik, J. Y., Lee, M. S., An, S. R., Yoon, S. K., Joo, E. J., Kim, Y. H., . . . Lee, G. M. (2006). Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnology and bioengineering*, 93(2), 361-371.
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*, 588(2), 253-260.
- Banik, G. G., & Heath, C. A. (1997). High-density hybridoma perfusion culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 61(3), 211-229.
- Becerra, S., Berrios, J., Osses, N., & Altamirano, C. (2012). Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 1-8.

- Becker, T., Hitzmann, B., Muffler, K., Pörtner, R., Reardon, K. F., Stahl, F., & Ulber, R. (2007). Future aspects of bioprocess monitoring *White biotechnology* (pp. 249-293): Springer.
- Bell, S. L., Bebbington, C., Scott, M. F., Wardell, J. N., Spier, R. E., Bushell, M. E., & Sanders, P. G. (1995). Genetic engineering of hybridoma glutamine metabolism. *Enzyme and microbial technology*, 17(2), 98-106. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00056-W](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)00056-W)
- Berrios, J., Diaz-Barrera, A., Bazan, C., & Altamirano, C. (2009). Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese hamster ovary cells cultured in mannose at low temperature. *Biotechnol Lett*, 31(10), 1493-1497. doi:10.1007/s10529-009-0050-1
- Bibila, T. A., & Robinson, D. K. (1995). In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production. *Biotechnology progress*, 11(1), 1-13.
- Bieberich, E. (2014). Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins *Glycobiology of the Nervous System* (pp. 47-70): Springer.
- Birch, J. R., & Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced drug delivery reviews*, 58(5), 671-685.
- Birol, G., Ündey, C., & Cinar, A. (2002). A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Computers & Chemical Engineering*, 26(11), 1553-1565.
- Blondeel, E. J., Braasch, K., McGill, T., Chang, D., Engel, C., Spearman, M., . . . Aucoin, M. G. (2015). Tuning a MAb glycan profile in cell culture: Supplementing N-acetylglucosamine to favour G0 glycans without compromising productivity and cell growth. *Journal of biotechnology*, 214, 105-112.
- Boghigian, B. A., Seth, G., Kiss, R., & Pfeifer, B. A. (2010). Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metabolic engineering*, 12(2), 81-95.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: Effect on productivity and product quality. *Biotechnology Progress*, 21(1), 17-21.
- Bonarius, H. P., Hatzimanikatis, V., Meesters, K. P., de Gooijer, C. D., Schmid, G., & Tramper, J. (1996). Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnology and bioengineering*, 50(3), 299-318.
- Bonham-Carter, J., & Shevitz, J. (2011). A brief history of perfusion biomanufacturing. *BioProcess Int*, 9(9), 24-30.
- Bonham-Carter, J., Weegar, J., Nieminen, A., Shevitz, J., & Eliezer, E. (2011). The Use of the ATF System to Culture Chinese Hamster Ovary Cells in a Concentrated Fed-Batch System. *Biopharm International*, 24(6), 42-+.
- Borys, M. C., Linzer, D. I., & Papoutsakis, E. T. (1993). Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Nature Biotechnology*, 11(6), 720.
- Bosques, C. J., Collins, B. E., Meador III, J. W., Sarvaiya, H., Murphy, J. L., DelloRusso, G., . . . Sipsey, S. F. (2010). Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1, 3-galactose antigens on proteins. *Nature biotechnology*, 28(11), 1153.
- Bulleid, N., Bassel-Duby, R., Freedman, R., Sambrook, J., & Gething, M. (1992). Cell-free synthesis of enzymically active tissue-type plasminogen activator. Protein folding determines the extent of N-linked glycosylation. *Biochemical Journal*, 286(Pt 1), 275.
- Burda, P., Jakob, C. A., Beinhauer, J., Hegemann, J. H., & Aepli, M. (1999). Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is

- ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology*, 9(6), 617-625.
- Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., & de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), 615-622.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(3), 283-291.
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1-3), 57.
- Butler, M., & Meneses-Acosta, A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(4), 885-894.
- Cacciatore, J. J., Chasin, L. A., & Leonard, E. F. (2010). Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology advances*, 28(6), 673-681.
- Castilho, L. R., & Medronho, R. A. (2002). Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (pp. 129-169): Springer.
- Çelik, E., & Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology advances*, 30(5), 1108-1118.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Chen, F., Ye, Z., Zhao, L., Liu, X., Fan, L., & Tan, W.-S. (2012a). Biphasic addition strategy of hypoxanthine and thymidine for improving monoclonal antibody production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(3), 347-352.
- Chen, F., Ye, Z., Zhao, L., Liu, X., Fan, L., & Tan, W.-S. (2012b). Correlation of antibody production rate with glucose and lactate metabolism in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology letters*, 34(3), 425-432.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P. A., & Wang, D. I. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 72(1), 55-61.
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab Eng*, 8(2), 123-132. doi:10.1016/j.ymben.2005.10.002
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8(2), 123-132.
- Chin, C.-S., Chubukov, V., Jolly, E. R., DeRisi, J., & Li, H. (2008). Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS biology*, 6(6), e146.
- Chon, J. H., & Zerbis-Papastoitsis, G. (2011). Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New biotechnology*, 28(5), 458-463.
- Chu, L., & Robinson, D. K. (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current opinion in biotechnology*, 12(2), 180-187.
- Clincke, M.-F., Mölleryd, C., Zhang, Y., Lindskog, E., Walsh, K., & Chotteau, V. (2011). *Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE Bioreactor™*. Paper presented at the BMC proceedings.

- Clincke, M. F., Mölleryd, C., Samani, P. K., Lindskog, E., Fäldt, E., Walsh, K., & Chotteau, V. (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE bioreactor™—part II: Applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnology progress*, 29(3), 768-777.
- Cloutier, M., & Wang, E. (2011). Dynamic modeling and analysis of cancer cellular network motifs. *Integrative Biology*, 3(7), 724-732.
- Coronel, J., Klausning, S., Heinrich, C., Noll, T., Figueredo-Cardero, A., & Castilho, L. R. (2016). Valeric acid supplementation combined to mild hypothermia increases productivity in CHO cell cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 101-109.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 127-138.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical reviews in biotechnology*, 34(4), 281-299.
- Croughan, M. S., Konstantinov, K. B., & Cooney, C. (2015). The future of industrial bioprocessing: Batch or continuous? *Biotechnology and bioengineering*, 112(4), 648-651.
- Crowell, C. K., Grampp, G. E., Rogers, G. N., Miller, J., & Scheinman, R. I. (2007). Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnology and bioengineering*, 96(3), 538-549.
- Cruz, H., Ferreira, A., Freitas, C., Moreira, J., & Carrondo, M. (1999). Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(5), 579-585.
- Cruz, H., Freitas, C., Alves, P., Moreira, J., & Carrondo, M. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and microbial technology*, 27(1), 43-52.
- Dalm, M. C., Cuijten, S. M., Van Grunsven, W. M., Tramper, J., & Martens, D. E. (2004). Effect of feed and bleed rate on hybridoma cells in an acoustic perfusion bioreactor: Part I. Cell density, viability, and cell-cycle distribution. *Biotechnology and bioengineering*, 88(5), 547-557.
- Dalm, M. C. F. (2007). *ACOUSTIC PERFUSION PROCESSES FOR HYBRIDOMA CULTURES: Viability, cell cycle and metabolic analysis*. (Doctor), Wageningen University, the Netherlands.
- De la Fuente, I. M., Cortes, J. M., Pelta, D. A., & Veguillas, J. (2012). Attractor metabolic networks. *PloS one*, 8(3), e58284-e58284.
- De Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C., & Archambault, J. (1993). Fed-batch culture of hybridoma cells: comparison of optimal control approach and closed loop strategies. *Bioprocess Engineering*, 9(1), 13-21.
- Dean, J., & Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1735-1747.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L.-E., Timmins, N. E., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2012). A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells. *PloS one*, 7(8), e43394.
- Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattová, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the

- glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *Journal of immunological methods*, 408, 24-34.
- Dorion-Thibaut, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fcγ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *Journal of Molecular Recognition*, 29(2), 60-69.
- Doxsey, S., Zimmerman, W., & Mikule, K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends in cell biology*, 15(6), 303-311.
- Drugmand, J.-C., Schneider, Y.-J., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology advances*, 30(5), 1140-1157.
- Duarte, T. M., Carinhas, N., Barreiro, L. C., Carrondo, M. J., Alves, P. M., & Teixeira, A. P. (2014). Metabolic responses of CHO cells to limitation of key amino acids. *Biotechnology and bioengineering*, 111(10), 2095-2106.
- Ducommun, P., Bolzonella, I., Rhiel, M., Pugeaud, P., Von Stockar, U., & Marison, I. (2001). On-line determination of animal cell concentration. *Biotechnology and bioengineering*, 72(5), 515-522.
- Ducommun, P., Ruffieux, P. A., Kadouri, A., Von Stockar, U., & Marison, I. (2002). Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnology and bioengineering*, 77(7), 838-842.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1110-1122.
- Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). *The therapeutic monoclonal antibody market*. Paper presented at the MABs.
- Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G., & Czermak, P. (2008). *Cell and tissue reaction engineering*: Springer Science & Business Media.
- Elias, C. B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., & Kamen, A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusiani insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology progress*, 19(1), 90-97.
- Elvin, J. G., Couston, R. G., & van der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *International journal of pharmaceuticals*, 440(1), 83-98.
- Eyer, K., Oeggerli, A., & Heinzle, E. (1995). On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. *Biotechnology and bioengineering*, 45(1), 54-62.
- Fahrner, R. L., Knudsen, H. L., Basey, C. D., Galan, W., Feuerhelm, D., Vanderlaan, M., & Blank, G. S. (2001). Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 18(1), 301-327.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Lund, A. M., Sen, J. W., Rasmussen, S. K., . . . Andersen, M. R. (2015). A multi-pronged investigation into the effect of glucose starvation and culture duration on fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 112(10), 2172-2184. doi:10.1002/bit.25620
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., . . . Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 521-535.

- FDA, U. S. F. D. A. (2016). Novel Drug Approvals for 2016.
- Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., Xie, L., Tang, H., & Chen, Z. (2006). Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. *Journal of Biotechnology*, 122(4), 422-430. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.09.017
- Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., Xie, L., Tang, H., & Chen, Z. (2006). Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. *Journal of biotechnology*, 122(4), 422-430. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.017>
- Fenge, C., Fraune, E., & Schügerl, K. (1992). Perfusion bioreactor performance at different cell bleed rates *Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products* (pp. 365-372): Elsevier.
- Fenge, C., & Lu, E. (2005). Cell culture bioreactors *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies* (pp. 173-242): CRC Press.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fernandez, F. J., & Vega, M. C. (2013). Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. *Current opinion in structural biology*, 23(3), 365-373.
- Figuet, D. (2010). *Les bioréacteurs jetables : synthèse sur la théorie du procédé et sur les applications industrielles*. École supérieur de microbiologie et sécurité alimentaire, Brunswick scientifique.
- Fiona, H., Tracy, W., Vicky, C., & Karl, M. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 0(0). doi:doi:10.1002/bit.26603
- Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology advances*, 33(8), 1878-1896.
- Fogolín, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 109(1), 179-191.
- Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., & Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 27(2), 708-710.
- Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G., & Wang, D. I. (2004). Maximizing interferon- γ production by chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. *Biotechnology and bioengineering*, 85(2), 177-184.
- Fox, S. R., Yap, M. X., Yap, M. G., & Wang, D. I. (2005). Active hypothermic growth: a novel means for increasing total interferon- γ production by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and applied biochemistry*, 41(3), 265-272.
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6), 1328-1337.
- Gagnon, P. (2010). How to choose an industrial cation exchanger for IgG purification. *BioProcess Int*, 8(9).
- Gaillet, B., Gilbert, R., Amziani, R., Guilbault, C., Gadoury, C., Caron, A. W., . . . Massie, B. (2007). High-Level Recombinant Protein Production in CHO Cells Using an Adenoviral Vector and the Cumate Gene-Switch. *Biotechnology Progress*, 23(1), 200-209.

- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., . . . Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(2), 203-215.
- Gambhir, A., Europa, A. F., & Hu, W.-S. (1999). Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(6), 805-810.
- Gambhir, A., Zhang, C., Europa, A., & Hu, W.-S. (1999). Analysis of the use of fortified medium in continuous culture of mammalian cells. *Cytotechnology*, 31(3), 243-254.
- Gawlitsek, M., Papac, D. I., Sliwowski, M. B., & Ryll, T. (1999). Incorporation of ¹⁵N from ammonium into the N-linked oligosaccharides of an immunoadhesin glycoprotein expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, 9(2), 125-131.
- Gawlitsek, M., Ryll, T., Lofgren, J., & Sliwowski, M. B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng*, 68(6), 637-646.
- Gawlitsek, M., Ryll, T., Lofgren, J., & Sliwowski, M. B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnology and bioengineering*, 68(6), 637-646.
- Genzel, Y., Ritter, J. B., König, S., Alt, R., & Reichl, U. (2005). Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology progress*, 21(1), 58-69.
- Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PloS one*, 9(3), e90832.
- Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(4), 469-487.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic Load and Heterologous Gene-Expression. *Biotechnology Advances*, 13(2), 247-261. doi:Doi 10.1016/0734-9750(95)00004-A
- Goldberg, D., Bern, M., North, S. J., Haslam, S. M., & Dell, A. (2008). Glycan family analysis for deducing N-glycan topology from single MS. *Bioinformatics*, 25(3), 365-371.
- Gong, X., Li, D., Li, X., Fang, Q., Han, X., Wu, Y., . . . Shen, B. Q. (2006). Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media. *Cytotechnology*, 52(1), 25-38.
- Gorfien, S. F., Paul, W., Judd, D., Tescione, L., & Jayme, D. W. (2003). Optimized nutrient additives for fed-batch cultures. *Biopharm international*, 16, 34-41.
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547-5551.
- Goudar, C., Biener, R., Zhang, C., Michaels, J., Piret, J., & Konstantinov, K. (2006). Towards industrial application of quasi real-time metabolic flux analysis for mammalian cell culture *Cell culture engineering* (pp. 99-118): Springer.
- Gowtham, Y. K., Saski, C. A., & Harcum, S. W. (2017). Low glucose concentrations within typical industrial operating conditions have minimal effect on the transcriptome of recombinant CHO cells. *Biotechnology Progress*, 33(3), 771-785.
- Gramer, M. J., Eckblad, J. J., Donahue, R., Brown, J., Shultz, C., Vickerman, K., . . . van Berkel, P. H. (2011). Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnology and bioengineering*, 108(7), 1591-1602.

- Gramer, M. J., Eckblad, J. J., Donahue, R., Brown, J., Shultz, C., Vickerman, K., . . . van Berkel, P. H. C. (2011). Modulation of Antibody Galactosylation Through Feeding of Uridine, Manganese Chloride, and Galactose. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(7), 1591-1602. doi:10.1002/bit.23075
- Gronemeyer, P., Ditz, R., & Strube, J. (2014). Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering*, 1(4), 188-212.
- Ha, T. K., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2015). Understanding of altered N-glycosylation-related gene expression in recombinant Chinese hamster ovary cells subjected to elevated ammonium concentration by digital mRNA counting. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(8), 1583-1593.
- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of Biotechnology*, 180, 23-29.
- Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2009). 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells—where do we go from here? *Biotechnology advances*, 27(6), 1023-1027.
- Han, Y., Liu, X.-M., Liu, H., Li, S.-C., Wu, B.-C., Ye, L.-L., . . . Chen, Z.-L. (2006). Cultivation of recombinant Chinese hamster ovary cells grown as suspended aggregates in stirred vessels. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(5), 430-435.
- Han, Y. K., Koo, T. Y., & Lee, G. M. (2009). Enhanced interferon- β production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. *Biotechnology progress*, 25(5), 1440-1447.
- Hansen, H. G., Pristovšek, N., Kildegaard, H. F., & Lee, G. M. (2017). Improving the secretory capacity of Chinese hamster ovary cells by ectopic expression of effector genes: lessons learned and future directions. *Biotechnology Advances*, 35(1), 64-76.
- Heine, H., Biselli, M., & Wandrey, C. (1999). High Cell Density Cultivation of Hybridoma Cells: Spin Filter vs Immobilized Culture *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products* (pp. 83-85): Springer.
- Hendrick, V., Winnepenninckx, P., Abdelkafi, C., Vandeputte, O., Cherlet, M., Marique, T., . . . Werenne, J. (2001). Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*, 36(1-3), 71-83.
- Henry, O., & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic engineering*, 13(5), 499-507.
- Henry, O., Kwok, E., & Piret, J. M. (2008). Simpler noninstrumented batch and semicontinuous cultures provide mammalian cell kinetic data comparable to continuous and perfusion cultures. *Biotechnol Prog*, 24(4), 921-931. doi:10.1002/btpr.17
- Hiller, G. W., Ovalle, A. M., Gagnon, M. P., Curran, M. L., & Wang, W. (2017). Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng*, 114(7), 1438-1447. doi:10.1002/bit.26259
- Hiller, G. W., Ovalle, A. M., Gagnon, M. P., Curran, M. L., & Wang, W. (2017). Cell-controlled hybrid perfusion fed-batch CHO cell process provides significant productivity improvement over conventional fed-batch cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 114(7), 1438-1447.
- Honda, H., Lenas, P., Watanabe, H., Kitade, T., & Kobayashi, T. (1998). Human antithrombin III variant production from recombinant BHK cells in a fed-batch culture with on-line

- control of glucose and glutamine concentrations. *Journal of fermentation and bioengineering*, 85(5), 532-535.
- Hong, J. K., Cho, S. M., & Yoon, S. K. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 869-876.
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949.
- Huang, C.-J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(3), 383-399.
- Huang, Y. M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1400-1410.
- Irani, N., Beccaria, A. J., & Wagner, R. (2002). Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology*, 93(3), 269-282.
- Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 188, 88-96.
- Jain, E., & Kumar, A. (2008). Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnology advances*, 26(1), 46-72.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Hu, W., & Yap, M. G. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10), 40.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology progress*, 21(1), 11-16.
- Jenkins, N., & Curling, E. M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme and microbial technology*, 16(5), 354-364.
- Jeong, D.-w., Kim, T. S., Lee, J. W., Kim, K. T., Kim, H. J., Kim, I.-H., & Kim, I. Y. (2001). Blocking of acidosis-mediated apoptosis by a reduction of lactate dehydrogenase activity through antisense mRNA expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(5), 1141-1149.
- Kadouri, A., & Spier, R. (1997). Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells. *Cytotechnology*, 24(2), 89.
- Kaisermayer, C., Reinhart, D., Gili, A., Chang, M., Aberg, P.-M., Castan, A., & Kunert, R. (2016). Biphasic cultivation strategy to avoid Epo-Fc aggregation and optimize protein expression. *Journal of biotechnology*, 227, 3-9.
- Kantardjieff, A., Jacob, N. M., Yee, J. C., Epstein, E., Kok, Y.-J., Philp, R., . . . Hu, W.-S. (2010). Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *Journal of biotechnology*, 145(2), 143-159.
- Karengera, E., Robotham, A., Kelly, J., Durocher, Y., De Crescenzo, G., & Henry, O. (2017). Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: impact on recombinant glycoprotein quality. *Journal of biotechnology*, 242, 73-82.
- Karst, D. J., Serra, E., Villiger, T. K., Soos, M., & Morbidelli, M. (2016). Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes. *Biochemical Engineering Journal*, 110, 17-26.

- Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., & Bailey, J. E. (1999). Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(5), 573-582.
- Kelley, B. (2007). Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnology progress*, 23(5), 995-1008.
- Khattak, S. F., Xing, Z., Kenty, B., Koyrakh, I., & Li, Z. J. (2010). Feed development for fed-batch CHO production process by semisteady state analysis. *Biotechnology progress*, 26(3), 797-804.
- Kim, D. Y., Chaudhry, M. A., Kennard, M. L., Jardon, M. A., Braasch, K., Dionne, B., . . . Piret, J. M. (2013). Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnology progress*, 29(1), 165-175.
- Kim, H., & Lee, G. M. (2007). Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(5), 712-720.
- Kim, J. Y., Kim, Y.-G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 917-930.
- Kim, N. S., & Lee, G. M. (2000). Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 71(3), 184-193.
- Kim, S. H., & Lee, G. M. (2007). Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 659-665.
- Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., . . . Aoyagi, H. (2015). Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 120(1), 78-84.
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Meskanen, E., Leisola, M., & Eerikäinen, T. (2007). On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(8), 561-566.
- Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., . . . Naveh, D. (2006). The “push-to-low” approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells *Cell Culture Engineering* (pp. 75-98): Springer.
- Kou, T.-C., Fan, L., Zhou, Y., Ye, Z.-Y., Liu, X.-P., Zhao, L., & Tan, W.-S. (2011). Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(3), 365-369.
- Kou, T.-C., Fan, L., Zhou, Y., Ye, Z.-Y., Zhao, L., & Tan, W.-S. (2011). Increasing the productivity of TNFR-Fc in GS-CHO cells at reduced culture temperatures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 136-143.
- Kretzmer, G. (2002). Industrial processes with animal cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2-3), 135-142.
- Kumar, N., Gammell, P., & Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53(1-3), 33-46.
- Kumar, N., Gammell, P., Meleady, P., Henry, M., & Clynes, M. (2008). Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC biotechnology*, 8(1), 42.

- Kunkel, J. P., Jan, D. C., Butler, M., & Jamieson, J. C. (2000). Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. *Biotechnology progress*, 16(3), 462-470.
- Kunkel, J. P., Jan, D. C., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 62(1), 55-71.
- Kurokawa, H., Park, Y. S., Iijima, S., & Kobayashi, T. (1994). Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(1), 95-103.
- Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., & Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(5), 502-510.
- Lagassé, H. D., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*, 6.
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of biotechnology*, 251, 128-140.
- Lam, C., Santell, L., Wilson, B., Yim, M., Louie, S., Tang, D., . . . Snedecor, B. (2017). Taming hyperactive hDNase I: Stable inducible expression of a hyperactive salt-and actin-resistant variant of human deoxyribonuclease I in CHO cells. *Biotechnology progress*, 33(2), 523-533.
- Langer, E. S. (2011). Trends in perfusion bioreactors. *BioProcess Int*, 9(4).
- Langer, E. S., & Rader, R. A. (2014). Continuous bioprocessing and perfusion: wider adoption coming as bioprocessing matures. *Bioprocess J*, 13, 43-49.
- Lannoo, N., & Van Damme, E. J. (2015). Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. *Plant Science*, 239, 67-83.
- Lao, M. S., & Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology progress*, 13(5), 688-691.
- Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., . . . Hu, W.-S. (2012). Multivariate analysis of cell culture bioprocess data—lactate consumption as process indicator. *Journal of Biotechnology*, 162(2), 210-223.
- Lee, F. W., Elias, C. B., Todd, P., & Kompala, D. S. (1998). Engineering Chinese hamster ovary (CHO) cells to achieve an inverse growth-associated production of a foreign protein, β -galactosidase. *Cytotechnology*, 28(1-3), 73-80.
- Lee, K. H., Lee, J., Bae, J. S., Kim, Y. J., Kang, H. A., Kim, S. H., . . . Chang, S. J. (2018). Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *Mabs*, 10(3), 380-396. doi:10.1080/19420862.2018.1433976
- Lee, M. S., & Lee, G. M. (2001). Effect of hypoosmotic pressure on cell growth and antibody production in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Cytotechnology*, 36(1-3), 61-69.
- Lee, S.-Y., Kwon, Y.-B., Cho, J.-M., Park, K.-H., Chang, S.-J., & Kim, D.-I. (2012). Effect of process change from perfusion to fed-batch on product comparability for biosimilar monoclonal antibody. *Process Biochemistry*, 47(9), 1411-1418.
- Lee, Y. Y., Yap, M. G., Hu, W. S., & Wong, K. T. (2003). Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology progress*, 19(2), 501-509.
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. Paper presented at the MABs.

- Li, L., Mi, L., Feng, Q., Liu, R., Tang, H., Xie, L., . . . Chen, Z. (2005). Increasing the culture efficiency of hybridoma cells by the use of integrated metabolic control of glucose and glutamine at low levels. *Biotechnology and applied biochemistry*, 42(1), 73-80.
- Li, Z., Michael, I. P., Zhou, D., Nagy, A., & Rini, J. M. (2013). Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5004-5009.
- Lim, J. A. C., Sinclair, A., Kim, D. S., & Gottschalk, U. (2007). Economic benefits of single-use membrane chromatography in polishing. *BioProcess Int. Feb.*
- Lim, S. H., Beers, S. A., French, R. R., Johnson, P. W., Glennie, M. J., & Cragg, M. S. (2010). Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *haematologica*, 95(1), 135-143.
- Lipscomb, M. L., Mowry, M. C., & Kompala, D. S. (2004). Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor. *Biotechnology progress*, 20(5), 1402-1407.
- Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, J., Albiol, J., Solà, C., & Cairó, J. J. (2015). Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(23), 9951-9960.
- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2014). The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 170, 17-27.
- Liu, C.-H., Chu, I.-M., & Hwang, S.-M. (2001). Enhanced expression of various exogenous genes in recombinant Chinese hamster ovary cells in presence of dimethyl sulfoxide. *Biotechnology letters*, 23(20), 1641-1645.
- Liu, X., Liu, H., Wu, B., Li, S., Ye, L., Wang, Q., . . . Chen, Z. (2006). Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(6), 1144-1151.
- Ljunggren, J., & Häggström, L. (1994). Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 44(7), 808-818.
- Lu, F., Toh, P. C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, J. (2013). Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(1), 191-205.
- Lu, S., Sun, X., & Zhang, Y. (2005). Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. *Process Biochemistry*, 40(5), 1917-1921. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.004>
- Ma, N., Ellet, J., Okediadi, C., Hermes, P., McCormick, E., & Casnocha, S. (2009). A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnology Progress*, 25(5), 1353-1363.
- Maranga, L., & Goochee, C. F. (2006). Metabolism of PER. C6TM cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and bioengineering*, 94(1), 139-150.
- Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P., & Sharfstein, S. T. (2014). Reduced culture temperature differentially affects expression and biophysical properties of monoclonal antibody variants. *Antibodies*, 3(3), 253-271.
- Matthews, T. E., Berry, B. N., Smelko, J., Moretto, J., Moore, B., & Wiltberger, K. (2016). Closed loop control of lactate concentration in mammalian cell culture by Raman

- spectroscopy leads to improved cell density, viability, and biopharmaceutical protein production. *Biotechnology and bioengineering*, 113(11), 2416-2424.
- McCracken, N. A., Kowle, R., & Ouyang, A. (2014). Control of galactosylated glycoforms distribution in cell culture system. *Biotechnol Prog*, 30(3), 547-553. doi:10.1002/btpr.1906
- McLeod, B. (2010). Characterization of Glycans from Erbitux®, Rituxan® and Enbrel® using PNGase F (Glycerol-free), Recombinant. *glycobiology & Protein tools*, V1.0.
- Mears, L., Stocks, S. M., Sin, G., & Gernaey, K. V. (2017). A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *Journal of Biotechnology*, 245, 34-46.
- Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., . . . Kadouri, A. (2006). Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality. *Journal of biotechnology*, 123(1), 106-116.
- Miranda-Hernandez, M. P., Lopez-Morales, C. A., Ramirez-Ibanez, N. D., Pina-Lara, N., Perez, N. O., Molina-Perez, A., . . . Medina-Rivero, E. (2015). Assessment of Physicochemical Properties of Rituximab Related to Its Immunomodulatory Activity. *Journal of Immunology Research*. doi:Artn 910763
10.1155/2015/910763
- Misaghi, S., Chang, J., & Snedecor, B. (2014). It's time to regulate: Coping with product-induced nongenetic clonal instability in CHO cell lines via regulated protein expression. *Biotechnology Progress*, 30(6), 1432-1440.
- Moore, A., Mercer, J., Dutina, G., Donahue, C. J., Bauer, K. D., Mather, J. P., . . . Ryll, T. (1997). Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*, 23(1-3), 47-54.
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guibault, C., Broussau, S., . . . Lo, R. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC biotechnology*, 6(1), 43.
- Mulukutla, B. C., Kale, J., Kalomeris, T., Jacobs, M., & Hiller, G. W. (2017). Identification and control of novel growth inhibitors in fed-batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 114(8), 1779-1790.
- Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., & Hu, W. S. (2016). Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends Biotechnol*, 34(8), 638-651. doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.012
- Nam, J. H., Zhang, F., Ermonval, M., Linhardt, R. J., & Sharfstein, S. T. (2008). The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1178-1192.
- Nilsson, I., & Von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5798-5801.
- Nivitchanyong, T., Martinez, A., Ishaque, A., Murphy, J. E., Konstantinov, K., Betenbaugh, M. J., & Thrift, J. (2007). Anti-apoptotic genes Aven and E1B-19K enhance performance of BHK cells engineered to express recombinant factor VIII in batch and low perfusion cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 98(4), 825-841.
- No, D., Yao, T.-P., & Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3346-3351.

- Noh, S. M., Park, J. H., Lim, M. S., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2017). Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(3), 1035-1045.
- Noh, S. M., Sathiyamurthy, M., & Lee, G. M. (2013). Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(4), 391-397.
- Noh, S. M., Shin, S., & Lee, G. M. (2018). Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. *Sci Rep*, 8(1), 5361. doi:10.1038/s41598-018-23720-9
- Ochoa, S. (2016). A new approach for finding smooth optimal feeding profiles in fed-batch fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 177-188.
- Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., & Tsumura, H. (2003). Control of temperature and pH enhances human monoclonal antibody production in CHO cell culture *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 169-172): Springer.
- Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., & Tsumura, H. (2006). pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology*, 52(3), 199-207.
- Ozturk, S. S. (1996). Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology*, 22(1-3), 3-16.
- Ozturk, S. S., Riley, M. R., & Palsson, B. O. (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 39(4), 418-431.
- Paredes, C., Prats, E., Cairo, J., Azorin, F., Cornudella, L., & Godia, F. (1999). Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology*, 30(1-3), 85-93.
- Park, J. H., Jin, J. H., Lim, M. S., An, H. J., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2017). Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells. *Scientific Reports*, 7. doi:ARTN 44246 10.1038/srep44246
- Patel, S. D., Papoutsakis, E. T., Winter, J. N., & Miller, W. M. (2000). The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. *Biotechnology progress*, 16(5), 885-892.
- Patnaik, S. K., & Stanley, P. (2006). Lectin-resistant CHO glycosylation mutants. *Methods in enzymology*, 416, 159-182.
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal*, 13(3).
- Petch, D., & Butler, M. (1994). Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *Journal of cellular physiology*, 161(1), 71-76.
- Pollock, J., Ho, S. V., & Farid, S. S. (2013). Fed-batch and perfusion culture processes: Economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty. *Biotechnology and bioengineering*, 110(1), 206-219.
- Poulain, A., Perret, S., Malenfant, F., Mullick, A., Massie, B., & Durocher, Y. (2017). Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *Journal of Biotechnology*.

- Puck, T. T., Cieciura, S. J., & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine*, 108(6), 945-956.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.
- Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current opinion in immunology*, 20(4), 471-478.
- Raju, T. S., Briggs, J. B., Borge, S. M., & Jones, A. J. (2000). Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*, 10(5), 477-486.
- Raju, T. S., & Jordan, R. E. (2012). *Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies*. Paper presented at the MABs.
- Ramirez, O. T., & Mutharasan, R. (1990). Cell cycle-and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 36(8), 839-848.
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J., & Miller, L. (1986). Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of immunological methods*, 86(1), 53-59.
- Richelle, A., & Lewis, N. E. (2017). Improvements in protein production in mammalian cells from targeted metabolic engineering. *Current opinion in systems biology*, 6, 1-6.
- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppi, A., & Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of cellular physiology*, 220(1), 144-154.
- Robinson, D., DiStefano, D., Gould, S., Cuca, G., Seamans, T., Benincasa, D., . . . Hollis, G. (1995). Production of engineered antibodies in myeloma and hybridoma cells: enhancements in gene expression and process design: ACS Publications.
- Robinson, T. A. B. a. D. K. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11 (1), pp 1-13.
- Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A single dynamic metabolic model can describe mAb producing CHO cell batch and fed-batch cultures on different culture media. *PLoS one*, 10(9), e0136815.
- Rosenlöcher, J. (2015). *Optimizing the glycosylation of recombinant proteins*. (Doctor rerum naturalium), Freie Universität Berlin.
- Rosenlöcher, J., Sandig, G., Kannicht, C., Blanchard, V., Reinke, S. O., & Hinderlich, S. (2016). Recombinant glycoproteins: The impact of cell lines and culture conditions on the generation of protein species. *Journal of proteomics*, 134, 85-92.
- Rouiller, Y., Perilleux, A., Collet, N., Jordan, M., Stettler, M., & Broly, H. (2013). A high-throughput media design approach for high performance mammalian fed-batch cultures. *Mabs*, 5(3), 501-511. doi:10.4161/mabs.23942
- Sabalza, M., Christou, P., & Capell, T. (2014). Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks. *Biotechnology letters*, 36(12), 2367-2379.
- Saccardo, P., Corchero, J. L., & Ferrer-Miralles, N. (2016). Tools to cope with difficult-to-express proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(10), 4347-4355.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangués, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial cell factories*, 15(1), 1.

- Sanyal, S., & Menon, A. K. (2009). Specific transbilayer translocation of dolichol-linked oligosaccharides by an endoplasmic reticulum flippase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 767-772.
- Sauer, P. W., Burky, J. E., Wesson, M. C., Sternard, H. D., & Qu, L. (2000). A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), 585-597.
- Schmelzer, A. E., & Miller, W. M. (2002). Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnology progress*, 18(2), 346-353.
- Schneider, M., Marison, I. W., & von Stockar, U. (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology*, 46(3), 161-185.
- Schwarz, F., & Aepli, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current opinion in structural biology*, 21(5), 576-582.
- Sengupta, N., Rose, S. T., & Morgan, J. A. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and bioengineering*, 108(1), 82-92.
- Seo, J. S., Kim, Y. J., Cho, J. M., Baek, E., & Lee, G. M. (2013). Effect of culture pH on recombinant antibody production by a new human cell line, F2N78, grown in suspension at 33.0 C and 37.0 C. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(12), 5283-5291.
- Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C., & Hu, W.-S. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing—physiological fundamentals *Cell Culture Engineering* (pp. 119-164): Springer.
- Sha, S., Agarabi, C., Brorson, K., Lee, D.-Y., & Yoon, S. (2016). N-Glycosylation design and control of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends in biotechnology*, 34(10), 835-846.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013a). The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 162-171.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2013b). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. *Journal of biotechnology*, 164(4), 469-478.
- Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., & Henry, O. (2014). Elucidating the effects of postinduction glutamine feeding on the growth and productivity of CHO cells. *Biotechnology Progress*, 30(3), 535-546. doi:10.1002/btpr.1907
- Sidoli, F., Mantalaris, A., & Asprey, S. (2004). Modelling of mammalian cells and cell culture processes. *Cytotechnology*, 44(1-2), 27-46.
- Sieglwart, P., Coˆte, J., Male, K., Luong, J. H., Perrier, M., & Kamen, A. (1999). Adaptive control at low glucose concentration of HEK-293 cell serum-free cultures. *Biotechnology Progress*, 15(4), 608-616.
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R-56R.
- Stiefel, F., Fischer, S., Sczyrba, A., Otte, K., & Hesse, F. (2016). miRNA profiling of high, low and non-producing CHO cells during biphasic fed-batch cultivation reveals process relevant targets for host cell engineering. *Journal of biotechnology*, 225, 31-43.
- Sun, Y.-t., Zhao, L., Ye, Z., Fan, L., Liu, X.-p., & Tan, W.-S. (2013). Development of a fed-batch cultivation for antibody-producing cells based on combined feeding strategy of glucose and galactose. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 126-135.
- Sung, Y. H., Song, Y. J., Lim, S. W., Chung, J. Y., & Lee, G. M. (2004). Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human

- thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. *Journal of biotechnology*, 112(3), 323-335.
- Sunley, K., & Butler, M. (2010). Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology advances*, 28(3), 385-394.
- Suzuki, M., Kato, C., & Kato, A. (2015). Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. *Journal of toxicologic pathology*, 28(3), 133-139.
- Swiech, K., Picanço-Castro, V., & Covas, D. T. (2012). Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein expression and purification*, 84(1), 147-153.
- Takahashi, K., Tereda, S., Ueda, H., Makishima, F., & Suzuki, E. (1994). Growth rate suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity. *Cytotechnology*, 15(1-3), 57-64.
- Tan, J. G., Lee, Y. Y., Wang, T., Yap, M. G., Tan, T. W., & Ng, S. K. (2015). Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed-batch bioreactors. *Biotechnology journal*, 10(5), 790-800.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 110(7).
- Teng, X., Yi, X., Sun, X., & Zhang, Y. (2011). Modeling and Application of Controlled-fed Perfusion Culture of CHO Cells in a Bioreactor. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 25(3), 385-394.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211.
- Thaisuchat, H., Baumann, M., Pontiller, J., Hesse, F., & Ernst, W. (2011). Identification of a novel temperature sensitive promoter in CHO cells. *BMC biotechnology*, 11(1), 51.
- Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 217, 122-131.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., . . . Katinger, H. (2006). Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1033-1044.
- Tsao, Y.-S., Cardoso, A., Condon, R., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J., . . . Liu, Z. (2005). Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of biotechnology*, 118(3), 316-327.
- Vallée, C., Durocher, Y., & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 169, 63-70.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., . . . Scarino, M. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1053-1063.
- Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology Journal*, 10(7), 1051-1066.

- Villiger, T. K., Steinhoff, R. F., Ivarsson, M., Solacroup, T., Stettler, M., Broly, H., . . . Morbidelli, M. (2016). High-throughput profiling of nucleotides and nucleotide sugars to evaluate their impact on antibody N-glycosylation. *Journal of biotechnology*, 229, 3-12.
- Vogel, J. H., Nguyen, H., Giovannini, R., Ignowski, J., Garger, S., Salgotra, A., & Tom, J. (2012). A new large-scale manufacturing platform for complex biopharmaceuticals. *Biotechnology and bioengineering*, 109(12), 3049-3058.
- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P. A., Baer, G., & Kadouri, A. (2003). Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(7), 751-765.
- Wahrheit, J., Nicolae, A., & Heinzle, E. (2014). Dynamics of growth and metabolism controlled by glutamine availability in Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(4), 1771-1783.
- Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, 28(9), 917.
- Walsh, G. (2014). *Biopharmaceuticals Approval Trends in 2013*. Retrieved from <http://www.biopharminternational.com/biopharmaceuticals-approval-trends-2013>
- Walther, J., Lu, J., Hollenbach, M., Yu, M., Hwang, C., McLarty, J., & Brower, K. (2018). Perfusion Cell Culture Decreases Process and Product Heterogeneity in a Head-to-Head Comparison With Fed-Batch. *Biotechnology Journal*, e1700733. doi:10.1002/biot.201700733
- White, J. (2010). The Business of Recombinant Protein Production. *Biotechnology; Ajinomoto AminoScience, Raleigh, North Carolina*.
- Wlaschin, K. F., & Hu, W.-S. (2006). Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding *Cell Culture Engineering* (pp. 43-74): Springer.
- Wong, D. C. F., Wong, K. T. K., Lee, Y. Y., Morin, P. N., Heng, C. K., & Yap, M. G. S. (2006). Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(2), 373-382.
- Woodside, S. M., Bowen, B. D., & Piret, J. M. (1998). Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. *Cytotechnology*, 28(1-3), 163-175.
- Wuest, D. M., Harcum, S. W., & Lee, K. H. (2012). Genomics in mammalian cell culture bioprocessing. *Biotechnology advances*, 30(3), 629-638.
- Wulhfard, S., Tissot, S., Bouchet, S., Cevey, J., De Jesus, M., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2008). Mild hypothermia improves transient gene expression yields several fold in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology progress*, 24(2), 458-465.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994a). Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnology*, 15(1-3), 17-29.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1994b). Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1164-1174.
- Xie, L., & Wang, D. I. (1997). Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells. *Trends in biotechnology*, 15(3), 109-113.
- Xing, Z., Kenty, B., Koyrakh, I., Borys, M., Pan, S.-H., & Li, Z. J. (2011). Optimizing amino acid composition of CHO cell culture media for a fusion protein production. *Process Biochemistry*, 46(7), 1423-1429.
- Xing, Z., Li, Z., Chow, V., & Lee, S. S. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnology Progress*, 24(3), 675-683.

- Xu, S., Jiang, R., Mueller, R., Hoesli, N., Kretz, T., Bowers, J., & Chen, H. (2018). Probing lactate metabolism variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology Progress*, 34(3), 756-766. doi:doi:10.1002/btpr.2620
- Yallop, C. A., Norby, P. L., Jensen, R., Reinbach, H., & Svendsen, I. (2003). Characterisation of G418-induced metabolic load in recombinant CHO and BHK cells: effect on the activity and expression of central metabolic enzymes. *Cytotechnology*, 42(2), 87-99. doi:DOI 10.1023/B:CYTO.00000009821.82741.8c
- Yang, J. D., Angelillo, Y., Chaudhry, M., Goldenberg, C., & Goldenberg, D. M. (2000). Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. *Biotechnol Bioeng*, 69(1), 74-82.
- Yang, J. D., Angelillo, Y., Chaudhry, M., Goldenberg, C., & Goldenberg, D. M. (2000). Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. *Biotechnology and bioengineering*, 69(1), 74-82.
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(4), 370-380.
- Yang, M., & Butler, M. (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology progress*, 18(1), 129-138.
- Yang, W. C., Minkler, D. F., Kshirsagar, R., Ryll, T., & Huang, Y.-M. (2016). Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity. *Journal of biotechnology*, 217, 1-11.
- Yang, W. C., Minkler, D. F., Kshirsagar, R., Ryll, T., & Huang, Y. M. (2016). Concentrated fed-batch cell culture increases manufacturing capacity without additional volumetric capacity. *Journal of Biotechnology*, 217, 1-11. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.10.009
- Yoon, S. K., Choi, S. L., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2005). Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 C. *Biotechnology and bioengineering*, 89(3), 345-356.
- Yoon, S. K., Hwang, S. O., & Lee, G. M. (2004). Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnology progress*, 20(6), 1683-1688.
- Yoon, S. K., Kim, S. H., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on foreign protein production in recombinant CHO cells *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (pp. 163-167): Springer.
- Yoon, S. K., Kim, S. H., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2006). Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 362-365.
- Yoon, S. K., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(3), 289-298.
- Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 1108-1115.
- Yusufi, F. N. K., Lakshmanan, M., Ho, Y. S., Loo, B. L. W., Ariyaratne, P., Yang, Y., . . . Lim, H. L. (2017). Mammalian systems biotechnology reveals global cellular adaptations in a recombinant CHO cell line. *Cell systems*, 4(5), 530-542. e536.
- Zafir-Lavie, I., Michaeli, Y., & Reiter, Y. (2007). Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*, 26(25), 3714.
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, 30(2), 238-245. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.021>

- Zanghi, J. A., Schmelzer, A. E., Mendoza, T. P., Knop, R. H., & Miller, W. M. (1999). Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. *Biotechnology and bioengineering*, 65(2), 182-191.
- Zhang, F., Sun, X., Yi, X., & Zhang, Y. (2006). Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology*, 51(1), 21-28.
- Zhang, H., Wang, H., Liu, M., Zhang, T., Zhang, J., Wang, X., & Xiang, W. (2013). Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*, 65(3), 363-378.
- Zhang, H., Wang, W., Quan, C., & Fan, S. (2010). Engineering considerations for process development in mammalian cell cultivation. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 103-112.
- Zhang, J. (2010). Mammalian cell culture for biopharmaceutical production *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Third Edition* (pp. 157-178): American Society of Microbiology.
- Zhang, L., Shen, H., & Zhang, Y. (2004). Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(2), 171-181.
- Zhang, X., Garcia, I. F., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2010). Hyperosmolality enhances transient recombinant protein yield in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology letters*, 32(11), 1587-1592.
- Zhang, Y. (2009). Approaches to optimizing animal cell culture process: substrate metabolism regulation and protein expression improvement *Biotechnology in China I* (pp. 177-215): Springer.
- Zhang, Y. (2017). *High cell density perfusion process development for antibody producing Chinese Hamster Ovary cells*. (Doctoral thesis), AlbaNova University Center, Sweden.
- Zheng, C., Zhuang, C., Chen, Y., Fu, Q., Qian, H., Wang, Y., . . . Qi, N. (2017). Improved process robustness, product quality and biological efficacy of an anti-CD52 monoclonal antibody upon pH shift in Chinese hamster ovary cell perfusion culture. *Process Biochemistry*.
- Zhou, W., Chen, C. C., Buckland, B., & Aunins, J. (1997). Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 783-792.
- Zhou, W., Rehm, J., Europa, A., & Hu, W.-S. (1997). Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. *Cytotechnology*, 24(2), 99-108.
- Zhou, W., Rehm, J., & Hu, W. S. (1995). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and bioengineering*, 46(6), 579-587.
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, 30(5), 1158-1170.
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Boom, T. V., & Lee, S. S. (2005). Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnology Progress*, 21(1), 70-77.

ANNEXE A – POSSIBILITÉ D'INDUCTION À HAUTE DENSITÉ CELLULAIRE

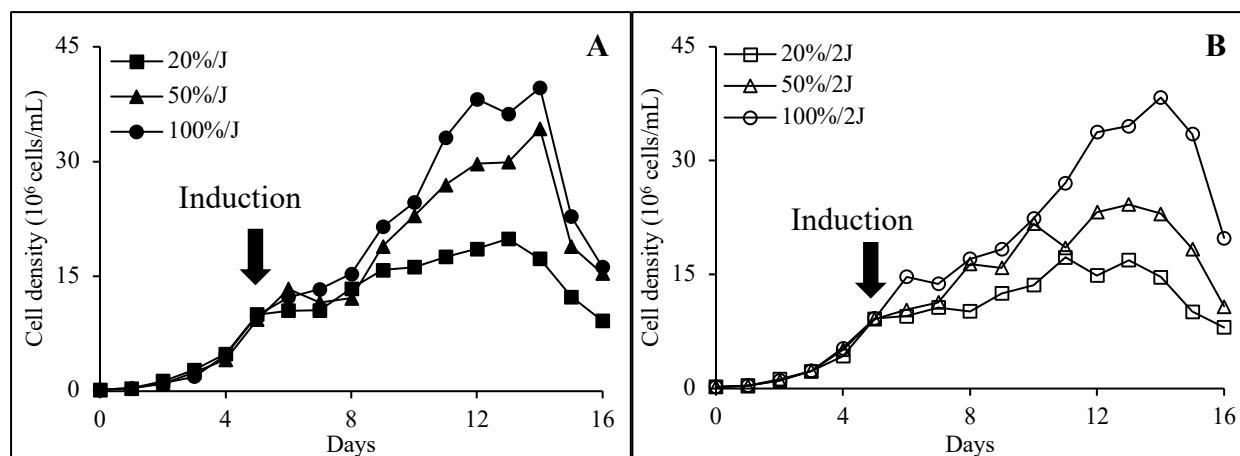


Figure A.1: Profil de croissance cellulaire en mode perfusion-alimentée. Deux stratégies de changement de milieu ont été effectuées : à chaque jour (A) et à chaque deux jours (B). Les symboles pleins représentent les cultures perfusées de manière journalière et les symboles vides celles perfusées à chaque deux jours. Les différents taux de perfusion réalisés sont: 20% (cercle), 50% (triangle) et 100% (carré)

ANNEXE B – FIGURE SUPPLÉMENTAIRE DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE EN FONCTION DES JOURS POST-INDUCTION

- 1) Cette figure complète le Chapitre 4. C'est une représentation différente des profils de croissance de la figure 4.1 qui décrit dans ce cas les jours post induction (durant la phase de production) au lieu des jours de culture.

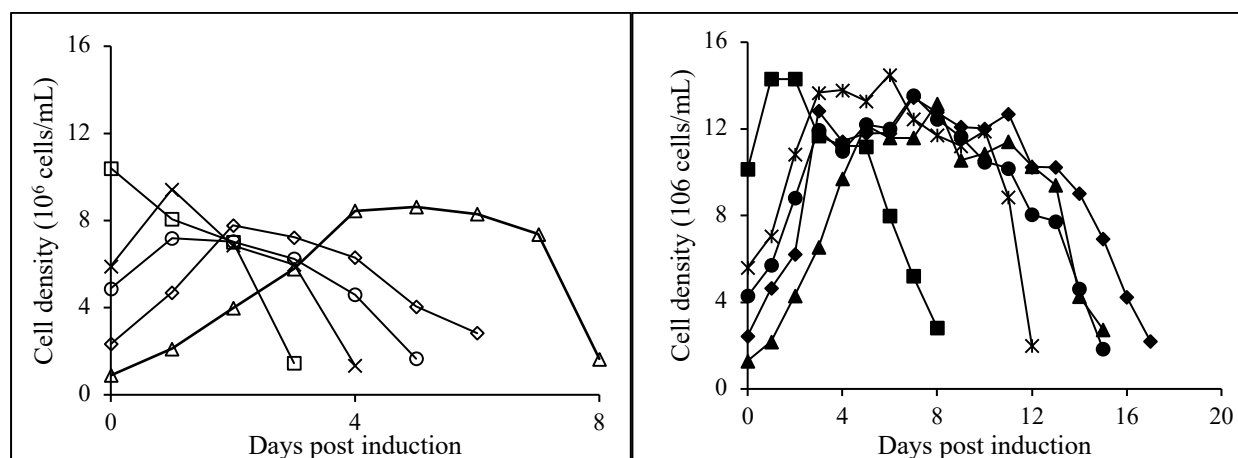


Figure B.1 : Viable cell concentration profiles in batch (A) and fed-batch cultures (B). Open symbols are used for batch and solid symbols for fed-batch. Cultures were induced at 1x10⁶ cells/mL (triangle), 2x10⁶ cells/mL (diamond), 4x10⁶ cells/mL (circle), 6x10⁶ cells/mL (cross) and 10x10⁶ cells/mL (square).

Table B.1 : Densité cellulaire à l'induction pour les cultures cuvée et cuvée-alimentée

Densité cellulaire à l'induction (10 ⁶ cells/mL)	
Culture cuvée	Culture cuvée-alimentée
0.95 ± 0.02	1.30 ± 0.11
2.33 ± 0.29	2.42 ± 0.15
4.58 ± 0.20	4.30 ± 0.24
5.91 ± 0.27	5.84 ± 0.31
10.41 ± 0.53	10.14 ± 0.64